



**You have downloaded a document from  
RE-BUS  
repository of the University of Silesia in Katowice**

**Title:** Badania frakcji lotnej metabolitów wtórnych wybranych gatunków szalwii (*Salvia* sp.) metodami chromatograficznymi GC-MS i LC

**Author:** Łukasz Wojtal

**Citation style:** Wojtal Łukasz. (2011). Badania frakcji lotnej metabolitów wtórnych wybranych gatunków szalwii (*Salvia* sp.) metodami chromatograficznymi GC-MS i LC. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI  
W KATOWICACH



Biblioteka  
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego

**ŁUKASZ WOJTAL**

**Badania frakcji lotnej metabolitów wtórnych wybranych  
gatunków szalwii (*Salvia sp.*) metodami chromatograficznymi  
GC-MS i LC**

Promotorzy pracy:

*prof. dr hab. Teresa Kowalska*

Zakład Chemii Ogólnej i Chromatografii

Uniwersytet Śląski w Katowicach

*prof. dr hab. Monika Waksmundzka-Hajnos*

Zakład Chemii Nieorganicznej

Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Praca doktorska wykonana

w Zakładzie Chemii Ogólnej i Chromatografii

Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

**Katowice 2011**

## Spis treści:

WSTĘP .....	5
CZEŚĆ TEORETYCZNA.....	7
1. Charakterystyka botaniczna badanych gatunków szalwii.....	8
1.1. Systematyka szalwii .....	8
1.2. Budowa morfologiczna i anatomiczna wybranych gatunków szalwii.....	9
1.2.1. <i>Salvia officinalis</i> L. (szałwia lekarska).....	9
1.2.2. <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl (szałwia lawendolistna).....	12
1.2.3. <i>Salvia sclarea</i> L. (szałwia muszkatołowa) .....	12
1.2.4. <i>Salvia nemorosa</i> L. (szałwia gajowa lub szalwia omszona) .....	13
1.2.5. <i>Salvia triloba</i> L. (szałwia krzewiasta lub szalwia grecka) .....	14
1.2.6. <i>Salvia pratensis</i> L. (szałwia łąkowa).....	15
2. Wybrane klasy związków zawartych w olejkach eterycznych.....	16
2.1.1. Monoterpeny .....	17
2.1.1.1. Monoterpeny acykliczne.....	18
2.1.1.2. Monoterpeny monocykliczne .....	19
2.1.1.3. Monoterpeny dicykliczne .....	22
2.1.1.4. Monoterpeny tricykliczne .....	23
2.1.2. Seskwiterpeny.....	23
2.1.3. Diterpeny .....	24
2.1.4. Triterpeny.....	26
3. Chemotaksonomia roślin i jej znaczenie dla nowoczesnej systematyki roślin.....	28
4. Metody wyodrębniania lotnych substancji zawartych w materiale roślinnym.....	29
4.1. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej ( <i>headspace</i> ) .....	29
4.3. Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa ( <i>ASE</i> ).....	32
5. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS) .....	34
6. Chromatografia cienkowarstwowa sprzężona ze spektrometrem mas (TLC/MS).....	39
7. Wybrane zastosowania technik chromatograficznych w analizie olejków eterycznych pochodzących z różnych gatunków szalwii ( <i>Salvia sp.</i> ) .....	42
CEL PRACY.....	45
CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	46

<b>1. Aparatura i odczynniki chemiczne.....</b>	<b>47</b>
<b>2. Metodyka przeprowadzonych badań.....</b>	<b>49</b>
2.1. Materiał roślinny.....	49
2.2. Destylacja w aparacie Derynga .....	49
2.3. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej ( <i>headspace</i> ) .....	49
2.4. Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ang. <i>Accelerated solvent extraction</i> , ASE) .....	50
2.5. Chromatografia gazowa z detektorem masowym (GC/MS).....	51
2.6. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC).....	52
2.7. Chromatografia cienkowarstwowa sprzężona z detektorem mas w wariacie jednowymiarowym (TLC-MS).....	52
2.8. Chromatografia cienkowarstwowa sprzężona z detektorem mas w wariacie dwuwymiarowym (TLC-LC-MS).....	53
2.9. Spektroskopia <sup>13</sup> C NMR .....	54
2.10. Wstępne przygotowanie danych do dalszej analizy .....	54
2.10.1. Eliminacja tła sygnału analitycznego.....	54
2.10.2. Usuwanie szumu z sygnału analitycznego .....	55
2.10.3. Nakładanie sygnałów analitycznych .....	56
2.11. Analiza czynników głównych (PCA) .....	57
<b>3. Porównanie efektywności wyodrębniania frakcji lotnej z różnych gatunków szalwii (<i>Salvia</i> L.) przy użyciu czterech technik izolacyjnych.....</b>	<b>58</b>
<b>4. Analiza chromatograficzna dwudziestu gatunków szalwii (<i>Salvia</i> sp.) techniką HS-GC/MS.....</b>	<b>75</b>
<b>5. Analiza olejków eterycznych zawartych w różnych gatunkach szalwii (<i>Salvia</i> L.) metodami niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC) z detekcją densytometryczną i chromatografii gazowej z detekcją masową (GC/MS).....</b>	<b>91</b>
<b>6. Analiza olejków eterycznych szalwii przy użyciu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrią masową (LT-TLC-MS).....</b>	<b>101</b>
<b>7. Analiza olejków eterycznych szalwii (<i>Salvia</i> L.) przy pomocy niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z detekcją masową (LT-TLC-MS) w wariacie jedno- i dwuwymiarowym .....</b>	<b>115</b>

8. Analiza składu chemicznego olejków eterycznych szalwii z zastosowaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz chromatografii gazowej z detekcją masową (GC/MS).....	131
9. Chemometryczna analiza chromatogramów gazowych frakcji lotnej dla różnych gatunków szalwii ( <i>Salvia sp.</i> ) traktowanych jako „odciski palca” .....	143
LISTA PRAC WŁASNYCH TEMATYCZNIE ZWIĄZANYCH Z ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ....	153
LISTA PUBLIKACJI KONFERENCYJNYCH TEMATYCZNIE ZWIĄZANYCH Z ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ.....	154
ŻYCIORYS .....	157
LITERATURA:.....	158

## WSTĘP

Tradycje ziołolecznictwa sięgają czasów prehistorycznych. Człowiek zawsze szukał w przyrodzie roślin, które przywracały mu zdrowie i siłę. Już od kilkudziesięciu wieków ludzkość zna uzdrawiające właściwości czosnku, rumianku, mięty, babki czy piołunu. Kolebką ziołolecznictwa był Egipt, gdzie uprawą i dozowaniem roślin o działaniu leczniczym zajmowali się kapłani. Chińska medycyna naturalna cieszy się zaufaniem już od ponad 5000 lat. W Indiach i Azji Południowo-Wschodniej wykorzystuje się około 1800 roślin leczniczych. Szacuje się, że na świecie istnieje około 400 tysięcy gatunków roślin, a 40 tysięcy z nich posiada właściwości farmakologiczne (z których analizie poddano zaledwie około 1,5%). Medycyna naturalna współistnieje z medycyną opartą na współczesnej nauce oraz na lekach syntetycznych i dzisiaj nie ma wątpliwości, że może wspomagać oficjalne metody stosowane przez lekarzy. Ziołolecznictwo stanowi również inspirację dla nowoczesnych metod leczenia, a obecnie obserwujemy nawrót i ponowne odkrywanie jakże bogatej i niezbadanej dotąd matki natury [1, 2].

Obecnie bardzo szybko rozwijającą się dziedziną (szczególnie w Europie Zachodniej, Japonii i Stanach Zjednoczonych), będącą połączeniem medycyny naturalnej i ziołarstwa, jest aromaterapia. Polega ona na wprowadzeniu do organizmu pacjenta poprzez układ oddechowy (inhalacje) lub przez skórę (masaż, kąpiel lub kompresy) biologicznie czynnych substancji z olejków eterycznych pochodzenia roślinnego. Aromaterapia to dosłownie leczenie zapachami, czyli lotnymi substancjami wytwarzanymi przez rośliny, tzw. olejkami eterycznymi. Szczegółowy skład chemiczny tych substancji to zazwyczaj nadal wielka tajemnica roślin. Niektóre rośliny zawierają nawet do kilkuset lotnych składników, z których wielu do tej pory nie zdołano rozszyfrować. Po raz pierwszy terminu „aromaterapia” użył francuski aptekarz i chemik, Rene Gattefosse na początku XX wieku, podejmując badania nad leczniczymi właściwościami olejków eterycznych. Najwcześniejsze wzmianki o używaniu zapachów pochodzą z czasów sumeryjskich (około 3000 r. p.n.e.) i dotyczą różnorodnych mieszanek roślinnych. Terapii za pośrednictwem soków z roślin poddawali się również Egipcjanie. Stosowanie olejków pochodzenia roślinnego potwierdza również Biblia, w której możemy przeczytać o podarunku z mirry od jednego z Trzech Króli przybyłych do nowonarodzonego Jezusa Chrystusa. Dzisiaj

aromaterapia zdobywa coraz większą popularność, a jej stosowanie staje się jednym ze sposobów poprawiania samopoczucia, jak również zdrowia [3, 4].

Aromaterapia jest coraz częściej wykorzystywana w życiu codziennym. W Japonii stwierdzono, iż rozpylenie w biurach olejku cytrynowego, powoduje zmniejszenie aż o 54% ilości błędów popełnianych przez pracowników obsługujących komputery. Badania prowadzone tamże wykazały również, że olejek mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.) o rześkim, świeżym zapachu mentolu poprawia koncentrację i usuwa zmęczenie pracą umysłową. Olejek cytrynowy (*Citrus limonum* Risso.) o ciepłym zapachu dojrzałego owocu cytryny orzeźwia i pobudza mikrokrazenie. Olejek rozmarynowy (*Rosmarinus officinalis* L.), jak również olejek bazyliowy (*Ocimum basilicum* L.) również pobudza pozwalając pokonać dekoncentrację i zmęczenie [5].

Obecnie około 70% światowej populacji korzysta wyłącznie z leków pochodzenia naturalnego. Bardzo często wynika to po prostu z biedy, jednak jak wspomniano na początku, obecnie obserwujemy renesans leków pochodzenia naturalnego również i w tych krajach, w których przemysł farmaceutyczny jest na bardzo wysokim poziomie, m.in. w Stanach Zjednoczonych, czy w Kanadzie.

## **CZEŚĆ TEORETYCZNA**



## 1. Charakterystyka botaniczna badanych gatunków szalwii

### 1.1. Systematyka szalwii [6]

Królestwo:	<i>Eucariota</i> – Jądownce
Podkrólestwo:	<i>Plantae</i> – Rośliny
Gromada:	<i>Spermatophyta</i> - Nasienne
Podgromada:	<i>Angiospermae (Magnoliophyta)</i> - Okrytozalążkowe
Klasa:	<i>Dicotyledoneae (Magnoliopsida)</i> - Dwuliścienne
Podklasa:	<i>Lamiidae</i> - Jasnotowe
Rząd:	<i>Lamiales</i> - Jasnotowce
Rodzina:	<i>Lamiaceae</i> - Jasnotowate
Rodzaj:	<i>Salvia</i> L. - Szalwia
Gatunek:	<i>Salvia amplexicaulis</i> Lam, <i>Salvia atropatana</i> Bunge, <i>Salvia azurea</i> Mchx., <i>Salvia cadmica</i> Boiss., <i>Salvia canariensis</i> L., <i>Salvia deserta</i> L., <i>Salvia forskaohlei</i> L., <i>Salvia glutinosa</i> L., <i>Salvia hians</i> Royle ex Benth, <i>Salvia jurisicii</i> Košanin, <i>Salvia lavandulifolia</i> Vahl, <i>Salvia nemorosa</i> L., <i>Salvia officinalis</i> L., <i>Salvia pratensis</i> L., <i>Salvia sclarea</i> L., <i>Salvia staminea</i> Montbret et Aucher., <i>Salvia stepposa</i> Shost., <i>Salvia tesquicola</i> Klokov & Pobed., <i>Salvia triloba</i> L., <i>Salvia verticillata</i> L.

## 1.2. Budowa morfologiczna i anatomiczna wybranych gatunków szalwii

### 1.2.1. *Salvia officinalis* L. (szałwia lekarska)

Szałwia lekarska pochodzi głównie z krajów basenu Morza Śródziemnego. Uprawiana jest również w innych częściach Europy, w Ameryce Północnej, także w Polsce. Jest rośliną wieloletnią. Krzewinka ta ma do 70 cm wysokości o pędach pokładających się, filcowato owłosionych. Łodyga w górnej części rośliny jest zielona, a w nasadzie zdrewniała. Liście są zimozielone i mają kształt podłużnie jajowaty do wąsko-eliptycznego. Są drobno ząbkowane, pokryte szarymi włoskami, przy czym młodsze liście są szare, a starsze liście mają intensywniej zielony kolor. Jasnofioletowe kwiaty są zebrane w szczytowe nibykółki. Szałwia kwitnie w czerwcu oraz lipcu. Jej owocem jest rozłupnia rozpadająca się na cztery okrągłe, brunatno-czarne niełupki. Cała roślina ma gorzki smak i silny zapach kamfory. Substancje aktywne zawarte w szalwii lekarskiej to olejek eteryczny (do 3,6%) bogaty w tujon, który jest głównym składnikiem olejku i stanowi do 60% jego składu. Oprócz tujonu obecne są także kwasy fenolowe (około 6%), flawonoidy, garbniki, gorycze i witaminy. Szałwia lekarska należy do roślin owadopylnych i miododajnych. Surowcem zielarskim są liście oraz ziele.

Zastosowanie szalwii jest dość rozległe. Oto najważniejsze obszary jej zastosowania:

#### - Farmakologiczne

Dzięki właściwościom dezynfekcyjnym, kojącym, ściągającym i przeciwzapalnym, napar z liści stosowany wewnętrznie korzystnie wpływa na funkcjonowanie pęcherzyka żółciowego i ułatwia trawienie, łagodzi stany zapalne żołądka i jelit, przeciwdziała bieguncie oraz nadmiernej potliwości. Napar ten jest środkiem przeciwkaszlowym, przeciwgrzybiczym, a nawet przeciwdepresyjnym. Jednak na skutek dużej zawartości tujonu w olejku szalwiowym, stosowanie wewnętrzne naparu z szalwii jest ograniczone. Nie powinno się wypijać więcej niż dwie do trzech szklanek naparu dziennie, a kobiety ciężarne powinny całkowicie unikać olejku szalwiowego. Napar zalecany jest również do użytku zewnętrznego przy zapaleniach dziąseł oraz błon śluzowych i gardła.

- Kulinarne

Szałwia może być stosowana jako dodatek do zup, mięs i ryb oraz jako składnik wielu ziołowych mieszanek przyprawowych. Liście szalwii, podsmażone na maśle i oleju, dobrze smakują z makaronem.

- Kosmetyczne

Ze względu na właściwości przeciwzapalne i przeciwbakteryjne ekstrakty z szalwii stosuje się jako dodatek do past do zębów, płynów do płukania ust, mydeł, czy szamponów. Odwar z liści używany jest do przyciemniania siwiejących włosów, a kąpiel w nim łagodzi stany zapalne skóry oraz pomaga ją oczyścić.

- Dekoracyjne

Kwiaty szalwii przyciągają pszczoły i motyle, i wyglądają wspaniale w ogrodach warzywnych, ziołowych, czy skalnych [7-14].



Rys.1. *Salvia officinalis* L. [15]

### 1.2.2. *Salvia lavandulifolia* Vahl (szałwia lawendolistna)

Półkrzew ten posiada prostą lub wstępującą gałąź. Osiąga od 30 do 100 cm wysokości. Liście są szypułkowe i jajowate, a młodsze liście są białawo-szare. Kwiaty wyrastają w okółkach po sześć do ośmiu. Korona ma długość od 2 do 2,5 cm i jest jasno białą-fioletową. Górna warga kwiatu jest prawie prosta, a dolna warga jest zwiotczała. Kielich ma często zwykłe włosy, ale żadnych gruczołowych włosków. Szałwia lawendolistna występuje jedynie na południu Francji i Hiszpanii oraz w północno-zachodniej Afryce. Rośnie w korytarzach skał na poziomie górskim. Napar z jej liści reguluje trawienie, ma działanie wykrztuśne i oczyszczające, obniża gorączkę i wzmacnia układ odpornościowy. Ma również zastosowanie w leczeniu zaburzeń menstruacyjnych, nerwic, depresji i psychoz [7].



Rys.2. *Salvia lavandulifolia* Vahl [16]

### 1.2.3. *Salvia sclarea* L. (szałwia muszkatołowa)

Szałwia muszkatołowa jest to wieloletnia roślina zielna, z łodygą kwadratową w przekroju z dużymi zielonymi liśćmi oraz białymi i niebieskimi kwiatami, wyrastającymi w kątach liści. Roślina ta osiąga wysokość do 1 m. Występuje od południowej Europy aż po Azję Środkową. Uprawiana jest również komercyjnie na wschodzie Europy, w Rosji i w Azji. Szałwia muszkatołowa jest szczególnie skuteczna w leczeniu ran, zaburzeń dyspeptycznych, chorób dróg oddechowych i w łagodzeniu

problemów menstruacyjnych. Olejek eteryczny tej szalwii jest popularny w aromaterapii. Stosuje się go również do wyrobu mydeł i perfum (m. in. wody kolońskiej) oraz napojów alkoholowych. Szalwia muszkatołowa wykazuje podobne efekty farmakologiczne co szalwia lekarska, jednak jej olejek ma inny skład i jest mniej toksyczny [8].



Rys.3. *Salvia sclarea* L. [17]

#### 1.2.4. *Salvia nemorosa* L. (szałwia gajowa lub szalwia omszona)

*Salvia nemorosa* L. znana jest w języku polskim jako szalwia gajowa lub szalwia omszona. Roślina ta ma od 20 do 50 cm wysokości. Łodyga jej jest gęsto ulistniona, w górnej części obficie pokryta białymi, krótkimi włoskami. Liście są jajowato-lancetowate, krótko zastrzone, o nasadzie sercowatej. Kwiaty są zebrane po cztery w zbliżone do siebie nibyokółki. Korona ma najczęściej zabarwienie niebiesko-fioletowe. Gatunek ten rośnie na łąkach, stepach i przydrożach. Dziką szalwię gajową można spotkać np. w okolicach Kijowa, na Wołyniu, na Podolu, na Opolszczyźnie oraz na Wyżynie Lubelskiej. W tureckiej medycynie naturalnej jest stosowana zewnętrznie w celu tamowania krwotoków [10, 18].



Rys.4. *Salvia nemorosa* L. [19]

#### 1.2.5. *Salvia triloba* L. (szałwia krzewiasta lub szałwia grecka)

*Salvia triloba* L. znana jest także jako *Salvia fruticosa* czy szałwia krzewiasta. Rośnie ona głównie w Grecji i dlatego nazywana jest też szałwią grecką. Liście tego gatunku odznaczają się występowaniem jednego lub dwóch bocznych „uszek”, znacznie mniej zaznaczonym unerwieniem na spodniej stronie liścia, a przede wszystkim dużą zawartością (do 60%) 1,8-cyneolu w olejku eterycznym i dlatego zapach jej liści przypomina nieco zapach liści eukaliptusa. Napar z liści szałwii krzewiastej stosuje się w leczeniu grypy, anginy, kaszlu z przeziębienia i bólów reumatycznych [7, 14].



Rys.5. *Salvia triloba* L. [20]

#### 1.2.6. *Salvia pratensis* L. (szałwia łąkowa)

Szałwia łąkowa to rodzima roślina wieloletnia. Liście ma dwojakiego rodzaju, odziomkowe zebrane w różyczkę, podługowato-jajowate lub pomarszczone i łodygowo siedzące. Kwiaty są koloru fioletowo-niebieskiego. Występuje w Polsce, gdzie można ją spotkać na miedzach, suchych łąkach i na trawiastych wzgórzach. Napar z liści szalwii łąkowej działa stymulująco na pracę przewodu pokarmowego, pobudza wydzielanie soków żołądkowych, przeciwdziała wzdęciom i ma działanie lekko antyseptyczne [7].



Rys.6. *Salvia pratensis* L. [21]



## 2. Wybrane klasy związków zawartych w olejkach eterycznych

Olejkami eterycznymi nazywamy substancje lotne o różnym charakterze chemicznym, charakteryzujące się silnym zapachem. Pozyskuje się je ze świeżych lub suszonych roślin. Olejek znajduje się najczęściej w specjalnych komórkach wydzielniczych, gdzie gromadzi się jako produkt przemiany materii. Komórki te są charakterystyczne dla roślin bogatych w olejki lotne, jak np. dla gatunków z rodziny sosnowatych, wargowych, liliowatych, mirtowatych, rutowatych, różowatych i baldaszkowatych. Do charakterystycznych cech fizykochemicznych olejków należą płynna konsystencja, lotność, czynność optyczna oraz charakterystyczny zapach. Pod względem składu jest to mieszanina rozmaitych związków chemicznych, takich jak terpeny, estry, alkohole, aldehydy, ketony, fenole, etery i węglowodory. Zawartość poszczególnych grup związków warunkuje terapeutyczne właściwości olejku. Olejki bogate w ketony znane są ze swych właściwości wspomagających gojenie ran, mukolitycznych czy uspokajających, natomiast olejki bogate w alkohole działają przeciwbakteryjnie, immunostymulująco i przeciwzapalnie. Dwie ostatnie właściwości zawdzięczają również kwasom i aldehydom. Działanie przeciwzapalne, przeciwhistaminowe i przeciwalergiczne warunkują terpeny [22]. Niestety, składniki olejków eterycznych wywołują również niekorzystne skutki uboczne. Wysoka zawartość aldehydów i fenoli może powodować podrażnienie skóry, a furanokumaryny mogą być odpowiedzialne za fototoksyczność. Saffrol posiada właściwości kancerogenne, natomiast regularne podawanie dużych ilości cytralu może prowadzić do obniżenia zdolności zagnieżdżenia się komórki jajowej, a nawet do przerwania ciąży [22, 23]. Udział poszczególnych składników w olejkach eterycznych jest zmienny i zależy od wielu czynników, m.in. od odmiany rośliny, pochodzenia geograficznego surowca, stadium wegetacji, a także od czynników genetycznych (genotypu). Nie zawsze jednak główny składnik jest nośnikiem podstawowego zapachu. Składniki towarzyszące mogą mieć istotny wpływ na kompozycję zapachową. Olejki eteryczne najlepiej jest otrzymywać przez destylację z parą wodną lub przez ekstrakcję przy pomocy lotnych rozpuszczalników [14, 24, 25, 36].

## 2.1. Terpeny

Terpeny to grupa substancji naturalnych, głównie pochodzenia roślinnego, o wzorze ogólnym  $(C_5H_8)_n$ . Są to węglowodory będące oligomerami izoprenu (2-metylobuta-1,3-dien), w których reszty izoprenowe są połączone według reguły izoprenowej, zgodnie z którą kolejne jednostki izoprenowe są powiązane według mechanizmu „głowa do ogona”. Izopren jest najczęściej występującym węglowodorem w ludzkim ciele. Wytwarzany jest przez organizm ludzki w tempie około  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ .

W zależności od stopnia polimeryzacji  $n$ , wyróżniamy:

- monoterpeny ( $C_{10}H_{16}$ ),  $n=2$ ;
- seskwiterpeny ( $C_{15}H_{24}$ ),  $n=3$ ;
- diterpeny ( $C_{20}H_{32}$ ),  $n=4$ ;
- sesterterpeny ( $C_{25}H_{40}$ ),  $n=5$ ;
- triterpeny ( $C_{30}H_{48}$ ),  $n=6$ ;
- tetraterpeny ( $C_{40}H_{64}$ ),  $n=8$ ;
- politerpeny,  $n>8$ .

Terpeny mogą również zawierać różnorodne grupy funkcyjne: hydroksylowe, karboksylowe, karbonylowe, czy nadtlenkowe i wtedy takie pochodne terpenowe nazywamy terpenoidami. Stanowią one główne składniki żywic drzew iglastych i olejków eterycznych. Wytwarzane są przez drzewa i krzewy iglaste, organizmy morskie, a niekiedy w małych ilościach również przez zwierzęta, głównie jako feromony.

Oligomery izoprenu, które nie spełniają reguły izoprenowej to izoprenoidy. Zaliczamy do nich steroidy, karotenoidy, irydoidy i kauczuk [14, 25, 26].

### 2.1.1. Monoterpeny

Monoterpeny to substancje biosyntetyzowane z dwóch jednostek izoprenowych. Mogą mieć charakter węglowodorów, ale znane są również liczne pochodne tlenowe, takie jak alkohole, aldehydy, ketony lub tlenki terpenowe. Monoterpeny są związkami ciekłymi lub stałymi o silnym zapachu. Są praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Bardzo często występuje w nich izomeria geometryczna i optyczna. Substancje te są bardzo

rozpowszechnione w świecie roślin. Stanowią główne składniki olejków eterycznych oraz substancji lotnych wydzielanych przez rośliny. Monoterpeny są bardzo popularnymi związkami o znanej i udokumentowanej aktywności. Ich działanie hamujące wzrost mikroorganizmów przedstawia się następująco:

- bakterie Gram-dodatnie:  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, cytral, limonen, geraniol, tujon;
- bakterie Gram-ujemne: cytral, mentol, geraniol;
- dermatofity: askardiol, cytral, cytronelal, cytronelol, geraniol, mentol, linalol, menton, octan tymolu;
- drożdże: cytral, geraniol [27].

Monoterpeny posiadają wiele istotnych właściwości farmakologicznych, m.in. działając drażniaco na błony śluzowe i na skórę. Stosowane zewnętrznie powodują lepsze ukrwienie, natomiast stosowane wewnętrznie wykazują działanie moczopędne, wykrztuśne, odkażające i przeciwświądowe. Używane są też jako środki aromatyzujące i kosmetyczne.

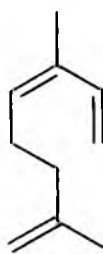
Pod względem struktury monoterpeny można podzielić na:

- a) monoterpeny acykliczne,
- b) monoterpeny monocykliczne,
- c) monoterpeny dicykliczne,
- d) monoterpeny tricykliczne.

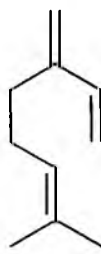
#### **2.1.1.1. Monoterpeny acykliczne**

Do monoterpenów acyklicznych zaliczamy związki chemiczne należące do następujących klas:

- Węglowodory  $C_{10}H_{16}$  - są to związki stosunkowo nietrwałe, które łatwo polimeryzują. Do tej grupy należą ocymen i  $\beta$ -mircen. Ocymen występuje w olejkach eterycznych bazylii i lawendy, natomiast  $\beta$ -mircen jest składnikiem olejków eterycznych chmielu i igieł świerku. Wykazuje on umiarkowane działanie antyoksydacyjne [28].

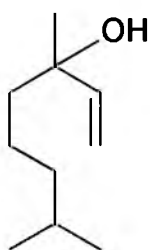


ocymen

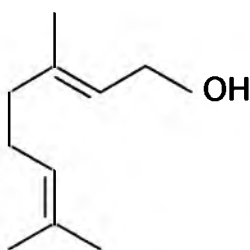


$\beta$ -mircen

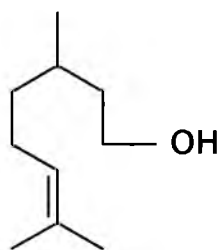
- Alkohole i aldehydy  $C_{10}H_{18}O$  lub  $C_{10}H_{17}O$  - związki te odznaczają się zazwyczaj przyjemnym zapachem. Stosowane są głównie w przemyśle kosmetycznym, jak również jako środki lecznicze w przypadku grzybiczych chorób skóry, włosów czy paznokci. Należą do nich m.in. linalol, geraniol, cytronelol i cytral a [14, 27].



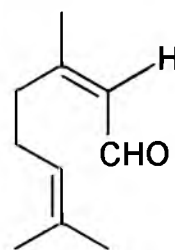
linalol



geraniol



cytronelol



cytral a

#### 2.1.1.2. Monoterpeny monocykliczne

Monoterpeny monocykliczne pochodzą od węglowodoru nasyconego o nazwie mentan ( $C_{10}H_{20}$ ), który ma zapach kminku i w niewielkim stężeniu występuje w olejkach rośliny *Syzygium cuminii* L. Terpeny te również ulegają polimeryzacji i utlenianiu.

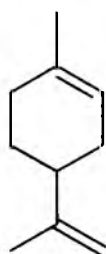
- Węglowodory: limonen, felandren i terpinen.

Limonen ma zapach pomarańczy i wykazuje właściwości antykancerogenne. Enancjomery limonenu wykazują działanie przeciwgrzybicze względem szczepów *Aspergillus*, jego izomery  $\beta$  są ogólnie bardziej aktywne, niż izomery

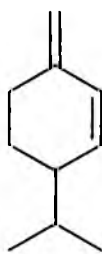
$\alpha$  [29, 30]. Inne badania potwierdzają zdolność limonenu do regresji złośliwego guza piersi o 80% [31, 32] oraz raka wątroby [33].

Felandren występuje w postaci izomerów  $\alpha$  i  $\beta$ . Ma on postać bezbarwnej cieczy o swoistym zapachu.

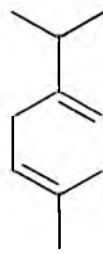
Terpinen posiada izomery  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Znane są silne właściwości antyoksydacyjne odmiany  $\gamma$ -terpinenu [28].



limonen



felandren

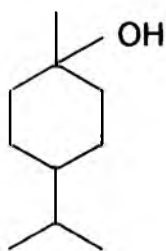


terpinen

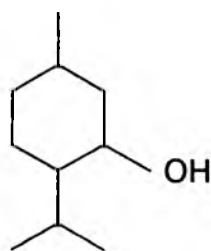
- Alkohole: terpineole i mentol.

Terpineole są to trzeciorzędowe nienasycone alkohole terpenowe. Największe znaczenie ma  $\alpha$ -terpineol, który posiada przyjemny zapach, przypominający bez. Przypuszcza się, że odpowiada on za działanie moczopędne roślin zawierających ten związek oraz że wzmacnia wydalanie jonów sodu, chloru, i kwasu moczowego. Długotrwałe podawanie  $\alpha$ -terpineolu powoduje podrażnienie nerek i krwiomocz [1, 2]. Poza tym jest on stosowany w przemyśle perfumeryjnym i kosmetycznym.

Mentol występuje w dużych stężeniach w olejku miętowym, otrzymywanym z mięty pieprzowej (*Mentha piperita* L.). Tylko mentol lewoskrętny wykazuje właściwości fizjologiczne przydatne w lecznictwie. Wykorzystywany jest w hamowaniu wzrostu szczepów bakterii Gram-ujemnych oraz w chorobach grzybiczych skóry [27].



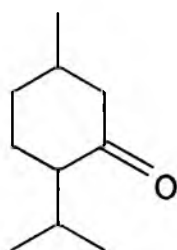
$\beta$ -terpineol



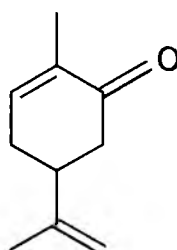
mentol

- Ketony: pulegon i karwon.

Karwon i pulegon wpływają pobudzająco na ośrodkowy układ nerwowy. Okazuje się, że oba te ketony wywierają silne działanie przeciwdrobnoustrojowe na 19 szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych oraz na 3 szczepy grzybów [34].



pulegon

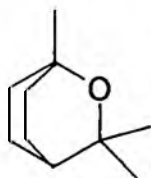


karwon

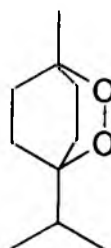
- Tlenki: 1,8-cyneol i askarydol.

1,8-Cyneol nazywany inaczej eukaliptolem, jest eterem o zapachu kamfory. Należy do najbardziej rozpowszechnionych składników olejków eterycznych, występujących w roślinach. Jest on głównym (do 95%) składnikiem olejku z eukaliptusa gałkowego (*Eucalyptus globulus* Labill.). Posiada głównie właściwości wykrztuśne i rozgrzewające.

Askarydol jest składnikiem trującego olejku pochodzącego z północnoamerykańskiego piołunu, zwanego komosą przeciwczerwiową. Posiada silne właściwości przeciwwrobacze, dzięki czemu znalazł zastosowanie w weterynarii [14, 25].



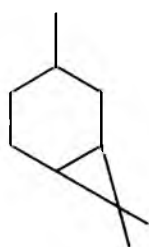
1,8-cyneol



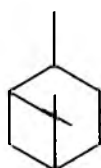
askarydol

### 2.1.1.3. Monoterpeny dicykliczne

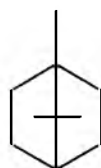
Monoterpeny dicykliczne dzielą się, pod względem budowy szkieletu węglowego, na cztery podstawowe grupy: karanu, pinanu, kamfanu i tujanu.



karan



pinan

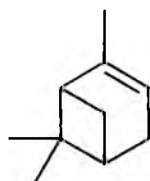


kamfan

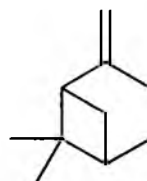


tujan

- Węglowodory:  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen. Są to bezbarwne ciecze o zapachu terpenowym.  $\alpha$ -Pinen występuje w olejku eterycznym kilkuset gatunków roślin i wykazuje działanie hamujące wzrost *Escherichia coli*, podczas gdy  $\beta$ -pinen jest w tym przypadku nieaktywny. W przypadku enancjomerów  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenu, odmiana (-) jest znacznie aktywniejsza niż odmiana (+) [35].  $\alpha$ - i  $\beta$ -Pinen są głównymi składnikami terpentyny z drewna sosny. Dodatkowo pineny mają znaczenie jako produkty wyjściowe dla syntezy citronelalu, citralu, kamfory, a także witamin A i E.



$\alpha$ -pinen



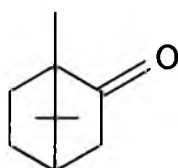
$\beta$ -pinen

- Alkohole i ketony: borneol, kamfora i tujon.

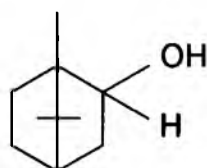
Borneol często występuje w olejkach eterycznych. Jest substancją krystaliczną o zapachu kamfory. Bardzo łatwo utlenia się do kamfory, która jest substancją łatwo sublimującą, krystaliczną, o charakterystycznym, ostrym zapachu. Kamfora jest stosowana zewnętrznie do nacierań w bólach reumatycznych.

Tujon jest silnie toksyczny, ma właściwości czerwibójcze, powoduje zaburzenia nerwowe, a nawet napady epileptyczne. Występuje w niewielkich

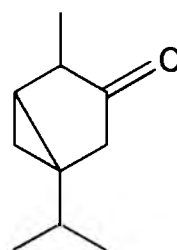
ilościach w absyncie – alkoholowym napoju wysokoprocentowym, otrzymywanym w procesie maceracji destylacji z różnego rodzaju ziół, przede wszystkim z kwiatów i liści piołunu (*Artemisia absinthium* L.) oraz z anyżu, z dodatkiem kopru włoskiego, hyzopu i innych. Na początku ubiegłego stulecia trunk ten był uwielbiany przez artystów, którym miał pomagać w procesie twórczym (boskie właściwości absyntu zachwalał sam Witkacy) i do dziś jego sprzedaż jest w wielu krajach zakazana. Okazuje się jednak, że to nie tylko tujon wpływa na odurzające właściwości napoju, a wysoka zawartość alkoholu (zwykle w granicach 70%) [11, 12, 14].



kamfora



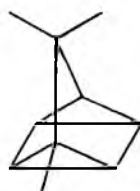
borneol



tujon

#### 2.1.1.4. Monoterpeny tricykliczne

Do monoterpenów tricyklicznych należy m.in. tricyklen. Działa on drażniąco na błony śluzowe i na skórę, powodując jej lepsze ukrwienie [25].



tricyklen

#### 2.1.2. Seskwiterpeny

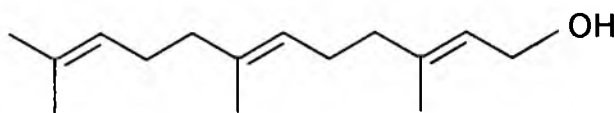
Seskwiterpeny to grupa związków pochodzenia naturalnego o wzorze ogólnym  $C_{15}H_{24}$ . Są one lepкими, gęstymi cieczami wrzącymi w temperaturze powyżej 250°C lub



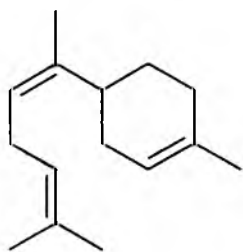
substancjami stałymi. Posiadają charakter węglowodorów, aldehydów, alkoholi, ketonów lub laktonów. Łatwo rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Seskwiterpeny możemy podzielić na:

- a) niecykliczne (łańcuchowe),
- b) monocykliczne,
- c) dicykliczne,
- d) tricykliczne,
- e) tetracykliczne.

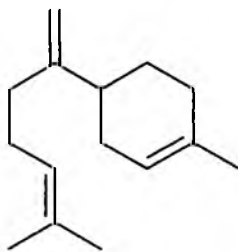
Do seskwiterpenów należą m.in. farnezoł,  $\alpha$ -bisabolen,  $\beta$ -bisabolen i gwajol.



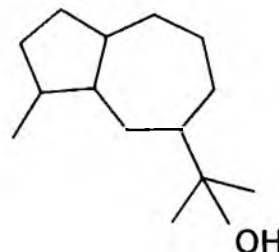
farnezoł



$\alpha$ -bisabolen



$\beta$ -bisabolen



gwajol

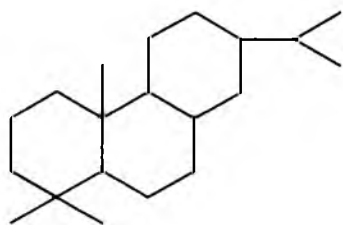
Związki te występują w roślinach, grzybach i organizmach zwierzęcych wykazując działanie obronne i odstraszające szkodniki. Niektóre z nich są składnikami olejków eterycznych. Pełnią również funkcję immunostymulatorów, hormonów roślinnych, feromonów płciowych, czynników przeciwnowotworowych, czy antybiotyków. Seskwiterpeny są również materiałem wyjściowym do produkcji wielu ważnych fizjologicznie związków, takich jak ubiquinon, czy kwas abscysynowy [25, 26, 36].

### 2.1.3. Diterpeny

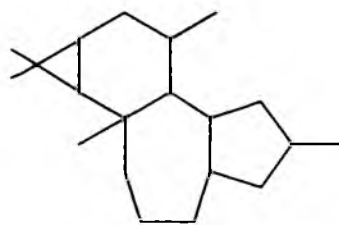
Diterpeny są to związki należące do grupy izoprenoidów o wzorze sumarycznym  $C_{40}H_{64}$ , odpowiadającym połączeniu składającemu się z 4 jednostek

izoprenowych. Charakteryzują się wysoką temperaturą wrzenia i są trudno lotne z parą wodną. Są to substancje występujące głównie w żywicach roślinnych. Związki diterpenowe mogą mieć strukturę liniową lub składającą się z jednego, dwóch lub więcej pierścieni [14, 25].

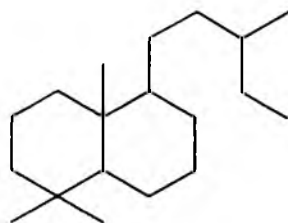
Główne typy budowy diterpenów to typ abietanu, typ tiglianu, typ labdanu, typ kauranu, typ klerodanu i typ gibanu.



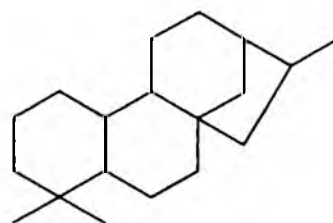
Typ abietanu



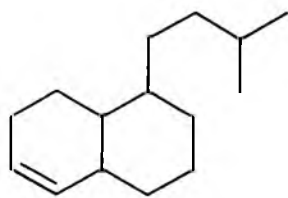
Typ tiglianu



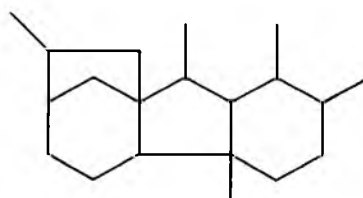
Typ labdanu



Typ kauranu



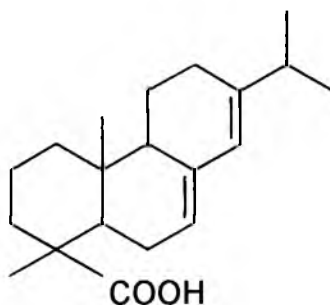
Typ klerodanu



Typ gibanu

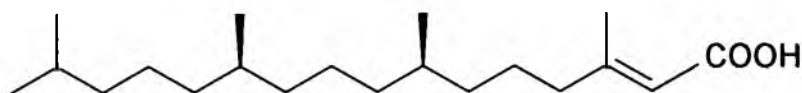
Ze względu na właściwości fizykochemiczne diterpeny można podzielić na diterpeny lipofilowe i hydrofilowe. Diterpeny hydrofilowe lepiej rozpuszczają się w wodzie, gdyż zwykle posiadają podstawnik zawierający atom tlenu. W tej grupie związków najbardziej znane są kwasy żywiczne i fitol [36, 37].

Kwasy żywiczne są głównymi składnikami kalafonii, która jest pozostałością po oddestylowaniu lotnych części żywic drzew iglastych. Najpopularniejszym składnikiem kalafonii jest kwas abietynowy. Ma on właściwości przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne, ale jest też alergizujący.



kwas abietynowy

Fitol jest to acykliczny alkohol diterpenowy, który jest składnikiem chlorofilu, witaminy E i K. W połączeniu z porfirynami nadaje chlorofilowi postać wosku [14, 25].

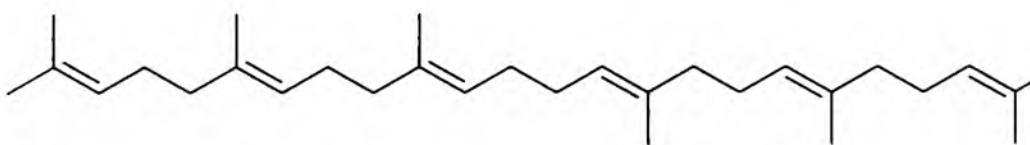


fitol

#### 2.1.4. Triterpeny

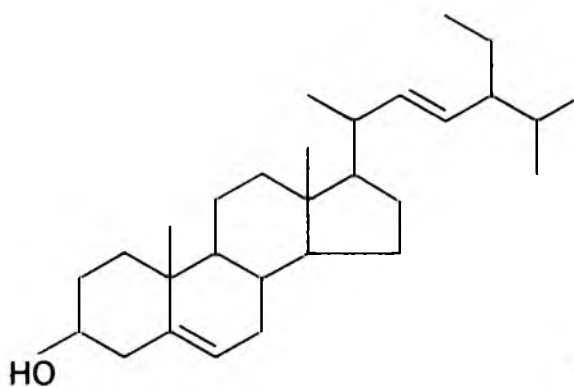
Triterpeny stanowią zróżnicowaną grupę związków o podstawowym wzorze sumarycznym  $C_{30}H_{48}$ . Zalicza się do nich zarówno związki łańcuchowe, np. skwalen, jak i wielopierścieniowe, np. steroidy czy saponiny. Do triterpenów należą m. in. substancje odstraszające oraz strukturalne składniki błon.

Skwalen został wyizolowany po raz pierwszy z tłuszczu zawartego w wątrobie rekina. Jest on półproduktem w biosyntezie alkoholi triterpenowych i steroli, i jest on również składnikiem tłuszczu ludzkiego. Ten nienasycony węglowodór ma konsystencję lepkiego, wysokowrzącego oleju. Częsteczka skwalenu składa się z dwóch jednakowych struktur, czyli każda jest zbudowana z 3 reszt izoprenowych w taki sposób, że spełniają regułę izoprenową, natomiast obie te struktury są połączone z sobą w sposób „ogon - ogon”, a więc niezgodnie z regułą izoprenową [14, 25].

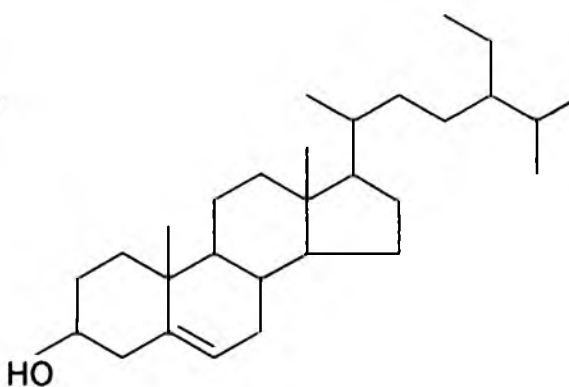


skwalen

Do steroidów zaliczane są sterole roślinne, takie jak stigmasterol, czy  $\beta$ -sitosterol. Związki te występują jako elementy strukturalne niektórych błon roślinnych, pełniąc funkcję analogiczną do cholesterolu w błonach komórek zwierzęcych. Inny sterol, anteridiol, występuje w grzybie *Achlya bisexualis*, pełniąc rolę feromonu.



stigmasterol



$\beta$ -sitosterol

Saponiny są to substancje naturalne o masie cząsteczkowej od 600 do 1500u. Wykazują zdolność zmniejszania napięcia powierzchniowego roztworów wodnych oraz hemolizowania erytrocytów. Są stosowane do półsyntezy hormonów płciowych i kortykosteroidów [14, 25, 26, 36].

### 3. Chemotaksonomia roślin i jej znaczenie dla nowoczesnej systematyki roślin

Taksonomia roślin stanowi dział systematyki roślin obejmujący teorię i praktykę klasyfikowania organizmów roślinnych, zajmujący się techniką wyróżniania i opisywania taksonów roślinnych, a więc ich klasyfikacją, nazewnictwem i hierarchizacją. Systematyka biologiczna roślin jest zaszłością historyczną pochodzącą jeszcze od Karola Linneusza, szwedzkiego przyrodnika, który swym dziełem pod tytułem „*Genera Plantarum*” w 1737 roku, stworzył podwaliny pod system klasyfikacyjny roślin, podstawę dzisiejszej botaniki. Oparta była na obserwacji zapładniania roślin, klasyfikowała je według kształtu słupka, pręcika oraz sposobu rozmnażania. W innej swojej pracy pod tytułem „*Systema Naturae*” Linneusz opisał podstawy stworzonego przez siebie systemu klasyfikacji organizmów oraz upowszechnił zasadę binominalnego nazewnictwa biologicznego roślin. Obecnie taksonomia roślin regulowana jest zasadami określonymi w Międzynarodowym Kodeksie Nomenklatury Botanicznej.

Chemotaksonomia jest dziedziną taksonomii wykorzystującą dane odnośnie do składu chemicznego w celu ulepszenia systematyki organizmów roślinnych i zwierzęcych. Dostarcza ona informacji bardziej elementarnych w porównaniu z morfologią i cytologią, przyczyniła się do wprowadzenia istotnych zmian w stosunku do wcześniejszych systemów, odgadujących powiązania filogenetyczne organizmów na podstawie prostego podobieństwa morfologicznego, zaproponowanego przez Linneusza w XVIII wieku. O tym, że niektóre rośliny odznaczają się pewnymi właściwościami fitochemicznymi, wiedzano już od dawna. Na tym przecież polegało użytkowanie, a nawet hodowla roślin do celów leczniczych czy spożywczych. Zwłaszcza w ostatnich pięćdziesięciu latach, zakres informacji na temat substancji czynnych zawartych w roślinach, ogromnie się rozszerzył i pogłębił, choć nadal chemotaksonomia jest stosunkowo młodą metodą badawczą. Możemy dziś mówić o chemotaksonomii roślin jako o osobnej gałęzi nauki, łączącej biochemię z systematyką roślin. Najbardziej użyteczna jest analiza metabolitów pierwotnych i wtórnych oraz nośników informacji genetycznej (kwasów nukleinowych i białek).

Znaczne udoskonalenie w II połowie XX wieku narzędzi analitycznych, jakimi posługuje się nowoczesna chemia, umożliwiło lepszy wgląd w skład chemiczny królestwa roślin. Jest to bardzo trudne wyzwanie naukowe ze względu na złożoność próbek pochodzenia naturalnego oraz ograniczoną ilość substancji wzorcowych, lecz

praca w tym zakresie pozwala na odkrywanie nowych, leczniczych właściwości roślin [38, 39].

#### 4. Metody wyodrębniania lotnych substancji zawartych w materiale roślinnym

##### 4.1. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej (*headspace*)

Metoda *headspace* jest obecnie najczęściej stosowaną metodą izolacji i oznaczania lotnych substancji z matryc nielotnych lub trudno lotnych, np. w środkach spożywczych, w analizie wód mineralnych, monomerów rozpuszczonych w polimerach, a także alkoholu zawartego we krwi. Polega ona na analizie gazu (pary) pozostającego w równowadze termodynamicznej z trudno lotną cieczą lub ciałem stałym. Metoda ta opiera się na zależności cząstkowego ciśnienia składnika  $i$  ( $p_i$ ) nad mieszaniną ciekłą od jego stężenia w ciekłej mieszaninie  $x_i$  zgodnie z prawem *Raoult*:

$$p_i = x_i p_i^0$$

gdzie:

$p_i$  – ciśnienie cząstkowe składnika  $i$  w fazie gazowej

$x_i$  – ułamek molowy składnika  $i$  w fazie ciekłej

$p_i^0$  – ciśnienie pary składnika  $i$  nad czystym składnikiem  $i$

W praktyce analitycznej często korzysta się z prostej zależności:

$$c_p = \frac{A_p}{A_{wz}} c_{wz}$$

gdzie:

$c_p$  – stężenie próbki

$c_{wz}$  – stężenie wzorca

$A_p$  – powierzchnia pików próbki

$A_{wz}$  – powierzchnia pików próbki

Analiza taka może być prowadzona dwoma sposobami:

- a) *Headspace* w wariancie statycznym – polega na bezpośredniej analizie lotnych zanieczyszczeń z par pozostających w równowadze z matrycą. Próbkę ciała stałego zawierającą oznaczane lotne składniki zamyka się w szczelnej fiolce z

membraną gumową i umieszcza w termostatowanej komorze w temperaturze odpowiedniej dla substancji badanej. Próbka jest utrzymywana w zadanej temperaturze do osiągnięcia stanu równowagi pomiędzy fazą stałą lub ciekłą a fazą gazową. Następnie strzykawka gazowa pobiera na odpowiedni sorbent określone ilości par, które są bezpośrednio dozowane do chromatografu (rys.1.). Stosowana jest do analizy związków lotnych i pozwala na detekcję około  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  g/dm<sup>3</sup>.

- b) *Headspace* w wariacie dynamicznym – polega na ciągłym unoszeniu fazy gazowej z fazy skondensowanej za pomocą przepływającego inertnego gazu, z późniejszym zatrzymaniem składników próbki przez adsorbent lub wymrażanie. Technika ta ma kilka zalet w stosunku do statycznej *headspace*. Pozwala ona na oznaczanie większej liczby substancji badanych, ze względu na brak wymogu dokładnego kontrolowania temperatury. Jest stosowana do oznaczania bardzo małych ilości lotnych substancji z nielotnych matryc [40-42].



Rys.7. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej (*headspace*)

Metody te dają więcej informacji o związkach bardziej lotnych, których pasma występują na początku chromatogramu, gdyż nie wymagają one obecności rozpuszczalników organicznych. Brak rozpuszczalnika pozwala również na eliminację

pochodzących od niego ewentualnych zanieczyszczeń. Należy także zwrócić uwagę na fakt, iż w fazie gazowej stężenie związków wysokowrzących jest znikome, zatem nie obciążają one kolumny analitycznej, co niewątpliwie przedłuża jej żywotność [24, 41].

#### 4.2. Destylacja z parą wodną w aparacie Derynga

Destylacja polega na odparowaniu najbardziej lotnego w danych warunkach ciśnienia i temperatury składnika, a następnie na skropleniu par i zebraniu destylatu. Jest to proces rozdzielania wieloskładnikowych mieszanin, z wykorzystaniem różnic w temperaturze wrzenia poszczególnych składników. Podczas ogrzewania cieczy prężność pary wzrasta, aż do momentu, gdy staje się równa ciśnieniu atmosferycznemu i rozpoczyna się wrzenie, czyli gwałtowne parowanie w całej objętości cieczy. Destylacja z parą wodną jest bardzo wygodną metodą oczyszczania substancji ciekłych i stałych, niemieszających się z wodą. Opiera się ona na prawie Daltona, które mówi, iż całkowita prężność pary nad mieszaniną niejednorodną stanowi sumę prężności par składników mieszaniny niezależnie od ilościowego stosunku składników:

$$p = p_1 + p_2 + \dots + p_i$$

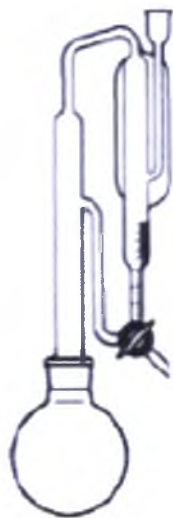
gdzie:

$p$  – całkowita prężność pary nad mieszaniną

$p_i$  – prężność pary składnika  $i$

Tak więc dopóki istnieją obie fazy ciekłe, destylat będzie miał stały skład, a temperatura wrzenia będzie niższa niż każdego ze składników osobno. Metoda ta jest stosowana do destylacji cieczy lub ciał stałych (niskotopliwych) o wysokich temperaturach wrzenia lub do wydzielania, lotnego z parą wodną, składnika ze złożonych mieszanin, jak np. do wyodrębniania olejków eterycznych z materiałów roślinnych.



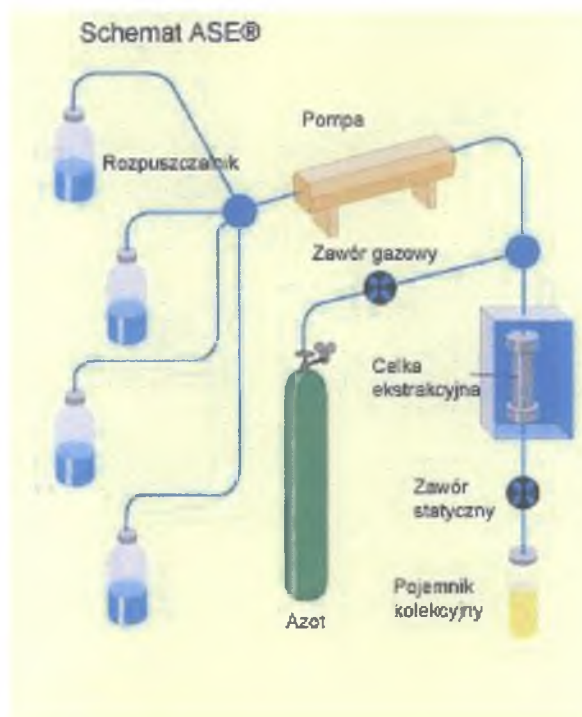


Rys.8. Schemat aparatu Derynga o zamkniętym obiegu wody

Destylację próbki surowca z wodą przeprowadza się w aparacie Derynga. Jak przedstawiono na rys. 8, jest on zbudowany z kolby szklanej, kolumny destylacyjnej, chłodnicy i odbieralnika, który przez trójdrożny kurek i rurkę przepływową łączy się z kolumną destylacyjną tworząc zamknięty obieg wody. Wydzielony olejek gromadzi się na powierzchni wody w odbieralniku [24, 43, 44].

#### 4.3. Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE)

Ekstrakcja (dosł. z łac. *extraho* – wyciągam) jest to metoda wyodrębniania z mieszaniny ciał stałych lub cieczy jakiegoś składnika przy pomocy rozpuszczalnika tak dobranego, aby rozpuszczał przede wszystkim żądany związek. ASE (z ang. *Accelerated Solvent Extraction*) jest jedną z alternatywnych technik ekstrakcji ciało stałe - ciecz. Przebiega ona w podwyższonej temperaturze i pod podwyższonym ciśnieniem. Zestaw do jej prowadzenia składa się ze zbiornika z rozpuszczalnikiem, celki ekstrakcyjnej, wykonanej przeważnie z kwasoodpornej stali i umieszczonej w piecu, pojemnika kolekcyjnego oraz butli z azotem, służącym do wymuszania ruchu rozpuszczalnika przez naczynie ekstrakcyjne w czasie pracy urządzenia (rys. 3.) [43, 45, 46].

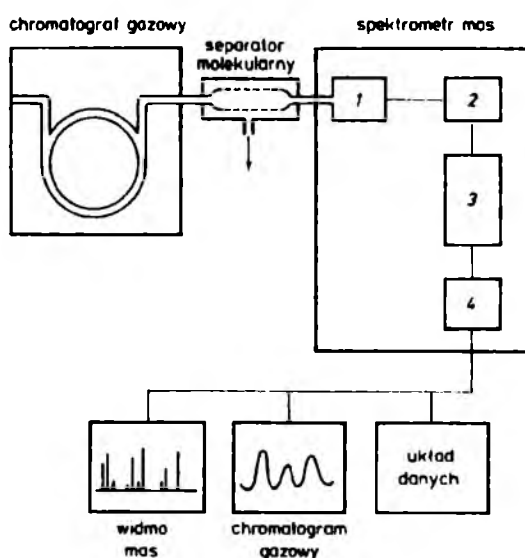


Rys.9. Schemat zestawu do prowadzenia ciśnieniowej ekstrakcji cieczowej (*ASE*)

Proces ten rozpoczyna się, gdy zimny rozpuszczalnik wypełni cały układ. Następnie naczynie (celka) z próbką jest ogrzewane do wybranej temperatury. Wskutek podgrzania, ciśnienie w układzie podwyższa się do 0,7 – 1,4 MPa i w tych warunkach odbywa się ekstrakcja. Potem anality z celki są wypłukiwane świeżą porcją rozpuszczalnika, którego ruch jest wymuszony nadciśnieniem azotu podawanego z butli. W ekstrakcji tej uzyskuje się stosunkowo łatwo oddzielenie ekstraktu od matrycy. Dzięki zastosowaniu gorących rozpuszczalników przy podwyższonym ciśnieniu następuje zwiększenie szybkości procesu ekstrakcyjnego. *ASE* można z powodzeniem wykorzystać do ekstrakcji takich analitów, jak dioksyny, pestycydy, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne czy polichlorowane bifenyle – metabolity roślinne, które występują w różnych matrycach: pyłach, glebach, tkankach, materiale roślinnym [40, 47].

## 5. Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC/MS)

Połączenie chromatografii gazowej i spektrometrii mas po raz pierwszy zaproponowali Holmes i Morrel w 1957 r. Jest ono przedstawione schematycznie na rys. 10.



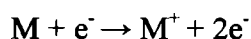
Rys. 10. Schemat blokowy bezpośredniego połączenia chromatografu gazowego ze spektrometrem mas; 1- komora jonizacyjna, 2-analizator mas, 3-powielacz elektronów, 4-wzmacniacz [40]

Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas jest jednym z najdoskonalszych narzędzi do badania struktury lotnych związków organicznych, które wchodzi w skład złożonych mieszanin. Układ ten jest skuteczny, ponieważ obie metody w tym połączeniu są zgodne ze sobą pod względem ilości próbki niezbędnej do analizy, stanu skupienia analizowanych związków, jak również temperatur wymaganych do ich rozdzielenia i analizy. Cechuje je duża czułość detekcji, a ponadto metody te mają porównywalne szybkości. Są jednak pewne różnice w warunkach działania tych metod. Podstawowa różnica między nimi polega na tym, że w kolumnie chromatografu gazowego panuje małe nadciśnienie (zwykle ok.  $10^5$  Pa), natomiast w kolumnie jonizacyjnej spektrometru masowego jest wysoka próżnia. W celu pokonania tej bariery stosuje się urządzenie pośrednie, tzw. „przejściówkę”, w postaci separatora molekularnego, umożliwiającego usunięcie nadmiaru gazu nośnego wypływającego z

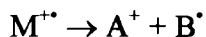
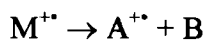
kolumny chromatograficznej, tak aby pompy próżniowe spektrometru nadążyły z utrzymaniem niskiego ciśnienia wewnątrz aparatu. Obecnie w układach GC/MS z reguły stosuje się tylko kolumny kapilarne, dla których separatory molekularne nie są wymagane. Wynika to z faktu, że natężenie przepływu gazu nośnego przez kolumnę kapilarną jest na tyle małe, że można je połączyć ze źródłem jonów spektrometru masowego bezpośrednio za pomocą dławika ciśnienia w postaci wąskiej kapilary wykonanej z kwarcu. W ten sposób zapewniony jest niezbędny spadek ciśnienia na odcinku od chromatografu do źródła jonów spektrometru. Kolejny sposób połączenia polega na wprowadzeniu części eluatu z kolumny do spektrometru mas, przy czym druga część może przechodzić przez inny detektor chromatograficzny. Takie rozwiązanie możemy stosować dla kolumn kapilarnych i pakowanych.

Drugi istotny problem techniczny związany z konstrukcją obu przyrządów wynika z konieczności rejestracji widm współbieżnie z elucją składników z kolumny chromatograficznej. Dlatego obecnie tradycyjne, elektromagnetyczne analizatory jonów zastępuje się zminiaturyzowanymi kwadropolowymi analizatorami spektrometrycznymi lub detektorami działającymi na zasadzie „pułapki jonów”. W obu rozwiązaniach rozdzielanie jonów ze względu na stosunek ich masy do ładunku odbywa się na zasadzie działania szybkozmiennych pól magnetycznych. Czas przemiatania można wówczas skrócić do mikrosekund, co pozwala na otrzymanie wielu widm w obrębie jednego pasma chromatograficznego [40, 41, 47, 48].

Zasada działania spektrometrii mas polega na jonizacji cząsteczek lub atomów, a następnie na ich rozpadzie na fragmenty charakterystyczne dla cząsteczek tych substancji i analizie powstających jonów (detekcji liczby i stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ) powstających jonów).



Jon molekularny  $M^+$  może ulec rozpadowi, odszczepiając cząsteczkę obojętną, kation lub rodnik:



gdzie:  $A^+$  – kation fragmentaryczny;  $A^{++}$  – fragmentaryczny kation rodnikowy;  $B$  – cząsteczka obojętna;  $B^{\bullet}$  – rodnik.

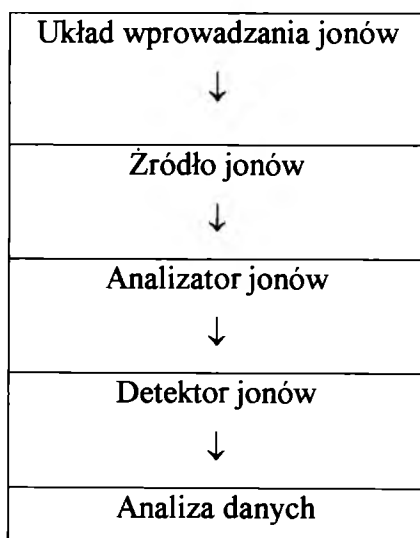
Fragmenty te, charakteryzujące się właściwym dla nich stosunkiem masy do ładunku ( $m/z$ ), są rozdzielane w polu elektrostatycznym i magnetycznym. Jeżeli w

wyniku fragmentacji powstaje niewielka liczba członów charakterystycznych dla analizowanej substancji i wśród nich jest jon cząsteczkowy o masie zbliżonej do masy cząsteczkowej analizowanego związku chemicznego, to wówczas możliwe jest oznaczenie jego masy cząsteczkowej. Natomiast większa liczba powstających fragmentów może być przydatna do lepszego określenia struktury cząsteczek analizowanych substancji. Każdy z pierwotnych jonów może ulec dalszej fragmentacji, która prowadzi do powstania kolejnych jonów, cząsteczek obojętnych i rodników. Powstałe w ten sposób jony są rozdzielane w analizatorze spektrometru mas zależnie od stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ) tworząc widmo, które dostarcza cennych informacji o składzie i strukturze analizowanych substancji.

Spektrometry mas różnią się między sobą sposobem jonizacji cząsteczek oraz sposobem rozdzielania jonów. Mimo tych różnic schemat blokowy dla wszystkich spektrometrów mas pozostaje ten sam (rys. 11).

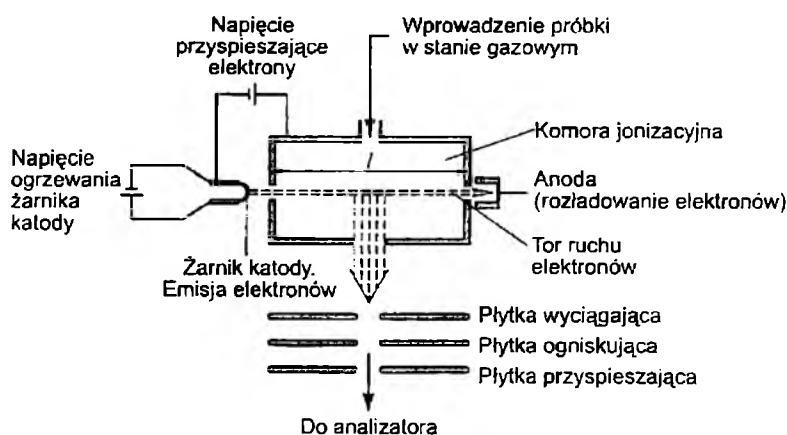
Aparatura składa się z następujących elementów:

- układu wprowadzającego próbkę,
- źródła jonów,
- analizatora jonów,
- detektora jonów,
- rejestratora.



Rys. 11. Schemat blokowy spektrometru mas [40]

Jonizację w spektrometrach masowych można przeprowadzić przy pomocy jonizacji elektronowej (ang. *electron impact* - EI), jonizacji polem (ang. *field ionization* - FI), jonizacji chemicznej (ang. *chemical ionization* - CI) oraz jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *atmospheric pressure ionization* - API), jednak najczęściej stosowana jest jonizacja strumieniem elektronów, która zachodzi w specjalnej komorze (rys. 12). W tej metodzie cząsteczki analizowanej substancji w postaci gazowej są bombardowane strumieniem elektronów emitowanych przez katodę. Elektrony te, na skutek różnicy potencjałów między elektrodami, są przyspieszane w kierunku anody. Wybitcie elektronu z cząsteczki następuje wówczas, gdy zostanie jej przekazana dostateczna ilość energii. Otrzymane w ten sposób jony zostają rozdzielane w zależności od masy oraz podlegają detekcji proporcjonalnie do ich wydajności. W ten sposób otrzymujemy widmo. Najkorzystniejsza i najszerzej stosowana jest energia strumienia elektronów równa 70 eV.



Rys. 12. Schemat źródła jonów z jonizacją strumieniem elektronów [48]

Przy bombardowaniu elektronami o małej energii fragmentacja cząsteczek zachodzi w niewielkim stopniu i w widmie masowym występuje intensywny pik jonów molekularnych. W przypadku bombardowania elektronami o dużej energii następuje intensywna fragmentacja.

Po rozdzieleniu składników mieszaniny i otrzymaniu ich widm masowych można zidentyfikować poszczególne komponenty obecne w mieszaninie, porównując

widmo masowe identyfikowanej substancji z widmami masowymi znajdującymi się w komercyjnej bibliotece wirtualnej komputera.

Podstawowa zaleta układu GC/MS polega na tym, że nie wymaga on wydzielania i oczyszczania komponentów mieszaniny w celu ich identyfikacji, gdyż fundamentalne informacje uzyskuje się z ich widm masowych, otrzymywanych w trakcie elucji tych składników z kolumny chromatograficznej. Samo widmo dostarcza wielu jednoznacznych informacji o budowie badanych związków, przede wszystkim umożliwiając określenie masy cząsteczkowej każdego składnika mieszaniny na podstawie stosunku  $m/z$  jonu molekularnego, jak również pozwalając na identyfikację pewnych charakterystycznych grup funkcyjnych związków organicznych pochodzących z odsczepienia niewielkich fragmentów od jonu molekularnego. Inne jony obecne w widmie można uszeregować w pewnej kolejności, wynikającej z tzw. dróg fragmentacji, czyli sekwencji reakcji fragmentacji jonu macierzystego, które są charakterystyczne dla określonych grup związków. Analiza ilościowa w metodzie GC/MS ma drugorzędne znaczenie, choć jest także możliwa. Wykorzystuje się ją najczęściej do oznaczeń śladowych zawartości pojedynczych substancji w złożonych mieszaninach.

Metoda GC/MS jest najefektywniejszą metodą oznaczenia śladowych ilości lotnych związków organicznych w złożonych matrycach naturalnych. Wykorzystuje się ją do badania substancji o złożonej budowie, takich jak np. składniki tkanek i płynów ustrojowych organizmów żywych, leki i ich metabolity, a także do rozwiązywania problemów z zakresu analizy zanieczyszczeń i ochrony środowiska naturalnego (np. do oznaczania pozostałości pestycydów w środkach spożywczych, w glebie i w wodzie). Oprócz tego metoda GC/MS jest stosowana w petrochemii, kosmetyce, biochemii, czy chemii klinicznej, a układ GC/MS oddaje nieocenione usługi w przypadku opracowywania rutynowych analiz dla potrzeb przemysłu. Jednorazowe określenie jakościowego składu mieszaniny surowców lub produktów pochodzących z danej syntezy organicznej daje możliwość wykonywania seryjnych ilościowych analiz tych mieszanin już przy użyciu chromatografu z prostszym, klasycznym detektorem, gdyż zwykle skład jakościowy tego typu mieszanin nie ulega zmianom [41, 47-51].

## 6. Chromatografia cienkowarstwowa sprzężona ze spektrometrem mas (TLC/MS)

Chromatografia to technika analityczna lub preparatywna służąca do rozdzielania i/lub badania składu mieszanin związków chemicznych. W chromatografii cienkowarstwowej fazę stacjonarną stanowi cienka warstwa adsorbentu lub nośnika naniesiona na sztywną płytkę. Na tak spreparowaną warstwę fazy stałej nanosi się próbkę roztworu rozdzielanych substancji, po czym na skutek działania sił kapilarnych, grawitacji lub pola elektrycznego następuje przepływ fazy ruchomej i rozdzielanie mieszaniny.

Podstawowe zalety chromatografii cienkowarstwowej są następujące:

- Można ją stosować do wstępnego doboru faz dla układów kolumnowych, gdyż zużycie rozpuszczalników w porównaniu z chromatografią kolumnową jest znacznie mniejsze;
- Na pojedynczej płytce chromatograficznej można równocześnie rozdzielać kilkanaście różnych próbek;
- Proces rozdzielania może być w każdej chwili zatrzymany;
- Można stosować elucję stopniową i/lub dwukierunkową (2D);
- Rozdzielane próbki nie muszą być wstępnie oczyszczane;
- Na podstawie wstępnych rozdzielen przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej można stwierdzić obecność analizowanego składnika i dopiero wówczas zastosować inne, bardziej kosztowne metody instrumentalne, np. wysokosprawną chromatografię cieczową czy chromatografię gazową; stwierdzono, iż takie postępowanie obniża koszty analizy o około 30 %;
- Metoda ta jest mniej pracochłonna w porównaniu z innymi metodami analitycznymi;
- Metoda ta jest przede wszystkim relatywnie tania, w porównaniu z innymi technikami chromatograficznymi;
- Istnieje możliwość rozwiązywania nawet skomplikowanych problemów analitycznych bez stosowania skomplikowanej aparatury [40, 50].

Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) to szybki, tani i wygodny sposób rozdzielania związków. Dawniej rozdzielone substancje były razem z fazą stacjonarną zeskrobywane z płytek chromatograficznych, wymywane, rozpuszczane w



odpowiednim rozpuszczalniku i poddawane detekcji najczęściej za pomocą chromatografu cieczowego.

Przeszło 20 lat temu podjęto próby połączenia chromatografii cienkowarstwowej (TLC) ze spektrometrią mas (MS) w analogiczny sposób do tego, w jaki sprzężony został układ chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (HPLC/MS). Luftmann, kierownik Zakładu Spektrometrii Masowej w Instytucie Chemii Organicznej Uniwersytetu w Münster (Niemcy) opracował interfejs (*ChromeXtractor*), który pozwalał na połączenie techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz spektrometrii mas (MS) [52, 53].

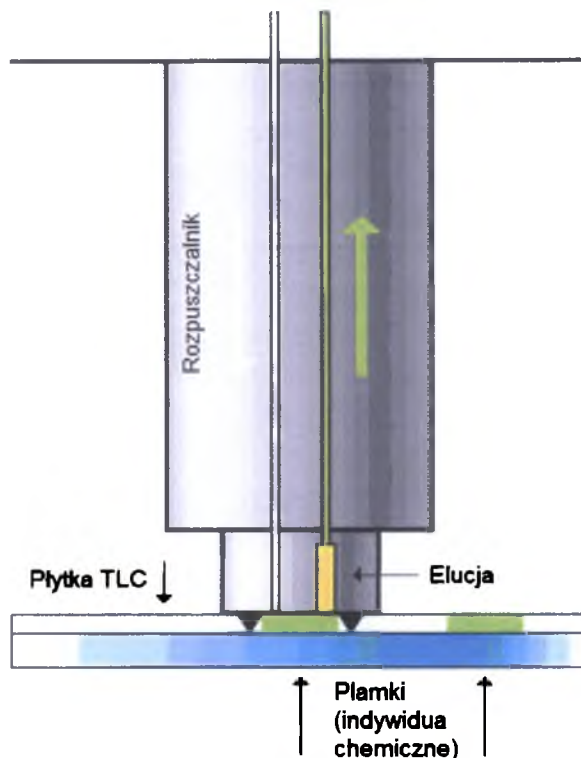
Morlock z Instytutu Chemii Żywności Uniwersytetu Hohenheim w Stuttgarcie (Niemcy) zmodyfikowała *ChromeXtractor* skonstruowany przez Luftmanna i w swoich badaniach wykazała większą skuteczność tego uniwersalnego interfejsu (rys. 13) [54-62] w porównaniu z innymi rozwiązaniami technicznymi zaproponowanymi przy połączeniu tego typu technik [63-65].



Rys.13. Interfejs TLC-MS firmy Camag (Muttentz, Szwajcaria)

Interfejs TLC/MS może zintegrować układ TLC z dowolnym systemem HPLC/MS bez żadnej modyfikacji. Źródło jonizacji w spektrometrze masowym może być również dowolne. Na uwagę zasługuje możliwość użycia dowolnej fazy ruchomej w układzie TLC, gdyż rozpuszczalniki zostają całkowicie odparowane, zanim nastąpi analiza przy pomocy spektrometru mas (MS). Wygodny i uniwersalny interfejs TLC/MS pozwala w prosty sposób wymywać poszczególne substancje bezpośrednio z

płytki chromatograficznej i kierować je do układów sprzężonych HPLC/MS. Przy pomocy dwóch łączników przystawka TLC/MS jest podłączona do pompy chromatografu cieczowego i do spektrometru mas. Substancje są eluowane bezpośrednio z płytek TLC i przekazywane do spektrometru mas, gdzie w ciągu bardzo krótkiego czasu rejestruje się widmo masowe wydzielanego związku (rys. 14).



Rys.14. Tłok ekstrakcyjny zastosowany w interfejsie TLC-MS

Przystawka TLC/MS działa w trybie półautomatycznym, gdyż zachodzi potrzeba ręcznego ustawienia pozycji tłoka. Ruch dźwigni uruchamia przepływ rozpuszczalnika. Ze względu na swoje zalety, takie jak powtarzalność wyników, wykrywalność podobną do techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC/MS), łatwe przenoszenie próbki bezpośrednio do spektrometru masowego, identyfikację nieznanymi substancji oraz wygodę stosowania, interfejs TLC/MS cieszy się coraz większą popularnością [66].

## 7. Wybrane zastosowania technik chromatograficznych w analizie olejów eterycznych pochodzących z różnych gatunków szalwii (*Salvia sp.*)

Obecnie na całym świecie naukowcy zajmują się analizą bardzo złożonych próbek pochodzenia naturalnego. Znakomite i niemalże doskonałe techniki instrumentalne pozwalają małymi krokami odkrywać uzdrawiające właściwości roślin, stosować nowe metody terapii na różnego rodzaju dolegliwości oraz poznawać tajemnice, jakie skrywa przed nami przyroda.

W artykule portugalskich naukowców [67] przedstawiono wyniki badań nad składem i właściwościami przeciwgrzybicznymi olejku pochodzącego z *Salvia officinalis* L. Analizę przeprowadzono techniką GC/MS. Zaobserwowano różnice ilościowe w składzie tych olejków, szczególnie w ilości *cis*-tujonu (8,8-37,1%) i kamfory (11,6-23,4%) w zależności od miejsca występowania rośliny. Grzybobójczą aktywność badanych olejków naukowcy ocenili przez minimalne stężenie blokujące (MIC) i minimalne stężenie śmiertelne (MLC), wyznaczone dla różnych chorób grzybiczych skóry. Badane olejki wykazały szerokie spektrum grzybobójcze, z podwyższoną aktywnością przeciw dermatofitom, powodującym powstawanie na skórze ognisk grzybiczych. Autorzy pracy stwierdzili, że olejek zawierający 10,4% *cis*-tujonu i 20,5% kamfory wykazywał najlepsze właściwości przeciwgrzybicze i był najbardziej aktywny.

Liang i in. [68] badali skład olejku eterycznego z kwiatów *Salvia miltiorrhiza* L. Olejki z kwiatów pochodzących z różnych regionów Chin wyodrębniono przy pomocy destylacji z parą wodną, następnie uzyskany destylat był ekstrahowany eterem, po czym wymrażano go w temperaturze -18°C w celu usunięcia wody. Próbkę analizowano techniką GC/MS. Komponentami badanych olejków były głównie monoterpeny, seskwiterpeny, kwasy tłuszczowe i alkany. Badania przeprowadzane techniką GC/MS wskazały, że dominującymi składnikami olejków eterycznych były  $\beta$ -kariofilen (12,2-31,7%),  $\alpha$ -kariofilen (4,8-10,6%), kwas heksadekanowy (3,9-18,8%) i kadinadien (7,4-29,3%).

W kolejnym artykule [69] brazylijscy naukowcy przedstawili wyniki swoich badań nad właściwościami przeciwbakteryjnymi olejków eterycznych zawartych w *Salvia officinalis* L. oraz w *Salvia triloba* L. Materiał roślinny pochodził z południowej Brazylii i do analizy użyto technikę GC/MS. W składzie olejku pochodzącego z *Salvia officinalis* L. zidentyfikowano głównie  $\alpha$ -tujon, 1,8-cyneol, borneol, kamforę i  $\beta$ -pinen,

natomiast w olejku *Salvia triloba* L. znajdowały się  $\alpha$ -tujon, 1,8-cyneol, kamfora i  $\beta$ -kariofilen. Wykazano również, że olejki eteryczne obu gatunków szalwii wykazują właściwości bakteriostatyczne i bakteriobójcze względem *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* i *Klebsiella oxytoca*.

Krstic i współpracownicy [70] badali skład olejków eterycznych i wosków pochodzących z *Salvia verticillata* L., w celu określenia, w jakim stopniu różnią się one w obrębie gatunku *Salvia* oraz oceny ich potencjału gospodarczego. Przy pomocy techniki GC/MS zidentyfikowano 39 substancji wchodzących w skład olejków lotnych tego gatunku. Senatore i inni [71] badali skład chemiczny olejku z *Salvia microstegia* L. pochodzącej z Libanu przy pomocy technik GC oraz GC/MS.

Kuźma i współpracownicy [72] badali zawartość terpenów w szalwii muskatołowej (*Salvia sclarea* L.) przy pomocy technik HPLC i GC/MS. Ich badania miały na celu wykazanie, jaki wpływ na produkcję substancji aktywnych mają światło i regulatory wzrostu. Stwierdzono, iż światło w znacznym stopniu wspomaga biosyntezę, natomiast regulatory wzrostu mogą powodować zmiany w niektórych częściach roślin, np. w korzeniach czy liściach, co nie zawsze jest równoznaczne ze zwiększoną produkcją substancji aktywnych przez roślinę.

Haznedaroglu i inni [73] badali właściwości przeciwbakteryjne olejku eterycznego, pochodzącego z *Salvia tomentosa* Mill. Analit ten otrzymano przez destylację z parą wodną i poddano go analizie techniką GC/MS. Badanie wykazało, że olejek eteryczny znacząco zahamował wzrost większości testowanych bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Skład olejku eterycznego i obserwacja jego właściwości antybakteryjnych pokazały, że gatunek szalwii *Salvia tomentosa* Mill. może być używany w aromaterapii oraz farmacji.

Horiuchi i współpracownicy [74] badali możliwości zwalczania drobnoustrojów przy pomocy karnozolu zawartego w szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.). Wyizolowany karnozol wykazywał słabą aktywność przy zwalczaniu drobnoustrojów. Podobne działanie wykazywał też kwas karnozolowy.

Lima i inni [75] badali własności przeciwutleniające oraz toksyczne olejku eterycznego pochodzącego z szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.), który został wyizolowany przez destylację z parą wodną. Analizę przeprowadzono technikami GC i GC/MS. Główne składniki badanego przez nich olejku to *cis*-tujon (17,4%), humulen (13,3%), 1,8-cineol (12,7%), *beta*-kariofilen (8,5%) i borneol (8,3%). Badania

wykazały, że olejek szalwii lekarskiej ma własności przeciwutleniające i nie jest toksyczny, kiedy jego stężenie nie przekracza 200 nL/mL.

Zhou i współpracownicy [76] prowadzili jakościowe i ilościowe badania diterpenów w dwunastu gatunkach szalwii przy pomocy chromatografii cieczowej (HPLC). Wykazano, że różnice jakościowe i ilościowe w składzie diterpenów są przydatne w chemotaksonomii, czyli w klasyfikacji organizmów ze względu na ich skład chemiczny.

Baricevic i współpracownicy [77] badali próbki szalwii lekarskiej (*Salvia officinalis* L.) uzyskane z naturalnych stanowisk w Słowenii, Austrii i Niemczech. Próbkę tę analizowano technikami TLC oraz HPLC/MS. Wykazano, że szczególne właściwości przeciwzapalne szalwii wykazuje kwas ursolowy oraz, że zawartość substancji biologicznie aktywnych zależy od miejsca hodowli rośliny – największą zawartość kwasu urosolowego odnotowano w składzie szalwii pochodzącej z rejonów Słowenii.

Deineka i współpracownicy [78] zajmowali się badaniem trigliceroli zawartych w olejkach roślinnych w obrębie rodziny *Lamiaceae*. W swoich badaniach wykorzystali technikę HPLC. Technika ta okazała się bardzo korzystna do identyfikacji wspomnianej grupy związków.

## CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było:

- (a) porównanie wydajności wybranych metod pozyskiwania olejków eterycznych z dwudziestu różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.);
- (b) jakościowe porównanie „odcisków palca” tzw. „fingerprintów” olejków eterycznych dla różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.) pochodzących z tej samej plantacji i z tego samego sezonu wegetacyjnego pod kątem ich zróżnicowania gatunkowego;
- (c) jakościowe porównanie „fingerprintów” olejków eterycznych dla różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.) pochodzących z tej samej plantacji, ale z różnych sezonów wegetacyjnych pod kątem ich zróżnicowania sezonowego;
- (d) częściowa identyfikacja składników olejków eterycznych dla dwudziestu różnych gatunków szalwii i wytypowanie wśród nich markerów chemotaksonomicznych oraz chemotaksonomicznych wskaźników pomocniczych;
- (e) opracowanie nowoczesnej procedury otrzymywania „fingerprintów” olejków eterycznych pochodzących z szalwii (*Salvia* L.), alternatywnej względem chromatografii gazowej z detekcją masową w wariancie *headspace* (HS-GC-MS);
- (f) chemometryczne porównanie „fingerprintów” olejków eterycznych dla dwudziestu różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.) pochodzących z tej samej plantacji i z tego samego sezonu wegetacyjnego pod kątem ich zróżnicowania gatunkowego.

## **CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA**

## 1. Aparatura i odczynniki chemiczne

Do badań zastosowano następującą aparaturę i odczynniki chemiczne:

- Aparat Derynga do destylacji z parą wodną;
- Chromatograf gazowy Trace 2000 (kolumna kapilarna DB-5 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) z detektorem mas MS Trace (Thermo Quest, Waltham, MA, USA) i z autosamplerem Combi PAL (CTC, Basel, Szwajcaria), pracującym również w trybie *head-space*, oprogramowaniem X-Calibur i biblioteką widm masowych NIST (*National Institute of Standards and Technology*, Gaithersburg, MD, USA);
- Interfejs TLC-MS (Camag, Muttenz, Szwajcaria);
- Spektrometr mas (MS), Varian 500-MS (Harbor City, CA, USA);
- Kolumna chromatograficzna Varian, typu Pursuit XRs-C18, wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm (nr kat. A6001050X020, Harbor City, CA, USA);
- spektrometr NMR Bruker Avance II 400 MHz z magnesem UltraShield Plus (Bruker, Madison, WI, USA)
- Ekstraktor ciśnieniowy ASE<sup>®</sup> 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA);
- Densytometr skaningowy model CD 60 (Desaga, Heidelberg, Niemcy) wyposażony w automatyczny aplikator model AS 30 (Desaga) oraz program ProQuant tej samej firmy współpracujący z systemem Windows;
- Program MATLAB r2007b (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA);
- Płytki szklane do chromatografii cienkowarstwowej (TLC) o wymiarach 10 cm × 20 cm pokryte 0,25 mm warstwą żelu krzemionkowego 60 F<sub>254</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy, nr kat. 1.05729.0001);
- Komora chromatograficzna typu *sandwich*, DS Chamber (Chromdes, Lublin, Polska);
- Filtry strzykawkowe 25 mm z tlenkiem glinu jako adsorbentem, średnica ziarna 0,25 μm (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy);
- Olejek sosny, olejek mięty pieprzowej, olejek eukaliptusa i olejek jałowca o zdefiniowanym składzie (Apotheca Pacis, Rybnik, Polska).
- Toluen, cz.d.a. (POCH, Gliwice, Polska);



- Octan etylu, cz.d.a. (POCH, Gliwice, Polska);
- Metanol, cz.d.a. (POCH, Gliwice, Polska);
- n-Heksan, cz.d.a. (POCH, Gliwice, Polska);
- Chloroform deuterowany do spektroskopii, 99,8% (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy);
- Trimetylosilan (TMS) do spektroskopii, 99,8% (Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy);

## 2. Metodyka przeprowadzonych badań

### 2.1. Materiał roślinny

Przedmiotem badań było dwadzieścia gatunków szalwii (*Salvia* L.): *Salvia amplexicaulis* Lam, *Salvia atropatana* Bunge, *Salvia azurea* Mchx., *Salvia cadmica* Boiss., *Salvia canariensis* L., *Salvia deserta* L., *Salvia forskaohlei* L., *Salvia glutinosa* L., *Salvia hians* Royle ex Benth, *Salvia jurisicii* Košanin, *Salvia lavandulifolia* Vahl, *Salvia nemorosa* L., *Salvia officinalis* L., *Salvia pratensis* L., *Salvia sclarea* L., *Salvia staminea* Montbret et Aucher., *Salvia stepposa* Shost., *Salvia tesquicola* Klovov & Pobed., *Salvia triloba* L., *Salvia verticillata* L., zebranych w 2007 i 2008 roku. Materiał botaniczny pochodził z Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Zioła suszono w suszarce z wymuszonym obiegiem powietrza w temperaturze 35 - 40 °C przez ok. 40 godzin. Otrzymany susz przechowywano do czasu analizy w stanie zamrożenia.

### 2.2. Destylacja w aparacie Derynga

W kolbie okrągłodennej o pojemności 1000 mL umieszczano 50 g suszonego materiału roślinnego. Następnie do kolby wprowadzano 400 mL wody redestylowanej i prowadzono destylację w aparacie Derynga przez 3 h [24]. Po zakończeniu destylacji zbierano otrzymany destylat (około 0,5 mL  $\approx$  1% masy badanych próbek).

### 2.3. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej (*headspace*)

Odważano 2g wysuszonych liści każdego gatunku szalwii i rozdrabniano je delikatnie w moździerzu porcelanowym. Tak przygotowane rośliny umieszczano w fiolkach do analizy nadpowierzchniowej o pojemności 10 mL i zamykano kapslami z membranami teflonowo - silikonowymi. Następnie próbki umieszczano w termostacie autosamplera i wygrzewano je w temperaturze 70°C lub 80°C przez 15 min. Próbkę fazy gazowej znad powierzchni suszu była dozowana do chromatografu gazowego w objętości 500  $\mu$ L przy użyciu autosamplera.

## 2.4. Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ang. *Accelerated solvent extraction, ASE*)

Do celki ekstrakcyjnej wprowadzono 5g rozdrobnionego w młynku porcelanowym suszu. Tak przygotowane próbki poddawano ekstrakcji w aparacie ASE® 200. Każda próbka była ekstrahowana trzy razy. Warunki ekstrakcji i jej poszczególne etapy przedstawiono w Tab. 1.

Tab. 1. Zastosowane warunki prowadzenia ekstrakcji ciśnieniowej (ASE) [79]

Temperatura pieca	105°C
Ciśnienie	65,8 atm
Czas oczyszczania próbki	1 min
Czas ogrzewania próbki	5 min
Czas ekstrakcji statycznej	10 min
Objętość płukania próbki	100%
Użyty rozpuszczalnik	Eter naftowy
Ilość cykli statycznych	3

Ekstrakty przechowywano w zamrażarce (-6°C) przez 24 h, w celu pozbycia się substancji balastowych. Następnie były one oczyszczane przez filtry strzykawkowe i w ilości 1 µL analizowane techniką GC/MS.

## 2.5. Chromatografia gazowa z detektorem masowym (GC/MS)

Do analizy użyto chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem mas i wyposażonego w automatyczny podajnik próbek. Dane uzyskane w trakcie analizy rejestrowano i opracowywano przy pomocy programu X-Calibur, zintegrowanego ze środowiskiem MS-Windows.

Tab. 2. Zastosowane warunki pracy chromatografu gazowego GC

Typ aparatu	Chromatograf gazowy TRACE 2000
Kolumna kapilarna	DB-5 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm
Gaz nośny	Hel pod ciśnieniem p=100 kPa
Program temperatury	40°C (3 min); 40 do 150°C ( 8°/min)
Warunki izotermiczne	150°C (15 min)
Temperatura dozownika	150°C
Energia jonizacji	70 eV
Wygrzewanie próbek	70°C (15 min)
Temperatura interfejsu	200°C
Temperatura źródła jonów	180°C

## 2.6. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)

Technikę chromatografii cienkowarstwowej zastosowano w celu wyodrębnienia grup związków zawartych w badanych olejkach eterycznych. Jako fazę stacjonarną zastosowano komercyjnie dostępne szklane płytki chromatograficzne o wymiarach 10 cm × 20 cm, pokryte warstwą żelu krzemionkowego o grubości 0,25 mm. Fazę ruchomą stanowiła mieszanina toluen – octan etylu w stosunku objętościowym 95:5 (v/v). Komorę chromatograficzną nasycano przez 30 minut parami fazy ruchomej. Otrzymane olejki наносzono w czystej postaci na płytkę chromatograficzną, w ilości 5 µL na plamkę. Płytki były rozwijane w komorach typu *sandwich* w temperaturze  $-10 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Obniżona temperatura prowadzenia analizy zapobiegała parowaniu substancji z powierzchni płytki chromatograficznej. Ze względu na lotny charakter badanych analitów zjawisko parowania łatwo mogłoby nastąpić w temperaturach wyższych niż ta zastosowana podczas chromatografowania, co potwierdzono kontrolną analizą prowadzoną w temperaturze pokojowej. Próbkę olejków eterycznych наносzono na płytki automatycznym aplikatorem. Długość drogi chromatografowania wynosiła 15 cm. Po rozwinięciu płytki suszono w temperaturze pokojowej przez 3 godziny. Następnie płytki skanowano przy pomocy densytometru skaningowego z lampą deuterową, przy długości fali 300 nm.

## 2.7. Chromatografia cienkowarstwowa sprzężona z detektorem mas w wariancie jednowymiarowym (TLC-MS)

Technika chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z detektorem mas pozwoliła na stosunkowo łatwą rejestrację widm masowych rozdzielonych frakcji badanych olejków eterycznych. Interfejs TLC-MS umożliwia wymywanie tych frakcji z płytki chromatograficznej i bezpośrednie wprowadzanie ich do detektora MS. Jako substancji wymywającej użyto metanolu. Dane uzyskiwane w trakcie analizy rejestrowano i opracowywano przy pomocy programu Varian MS Workstation 6.91. W Tab. 3. przedstawiono warunki pracy spektrometru mas podczas rejestracji widm poszczególnych frakcji olejków eterycznych wymywanych z chromatogramu.

Tab. 3 Parametry pracy spektrometru mas podczas rejestracji widm frakcji olejków eterycznych rozdzielonych techniką chromatografii cienkowarstwowej

Tryb	ESI-MS
Temperatura komory jonizacji dodatniej (temperatura źródła jonów)	45°C
Temperatura gazu osuszającego	150°C
Ciśnienie gazu osuszającego	25 Pa
Napięcie kapilary	70 V
Napięcie przy nastrzyku	5 kV
Prędkość przepływu fazy ruchomej	0,2 mL/min

## 2.8. Chromatografia cienkowarstwowa sprzężona z detektorem mas w wariacie dwuwymiarowym (TLC-LC-MS)

Chromatografię cienkowarstwową połączoną z wysokosprawną chromatografią cieczową zastosowano w celu uzyskania lepszego rozdziłu frakcji wstępnie rozdzielonych przy pomocy techniki TLC badanych destylatów *Salvia triloba* i *Salvia lavandulifolia*.

Warunki prowadzenia analizy w wariacie dwuwymiarowym były takie same, jak w wariacie jednowymiarowym, jednakże w tym eksperymencie zastosowano również rozdział techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Pomiędzy interfejsem TLC a spektrometrem masowym umieszczono kolumnę chromatograficzną (Varian, typu Pursuit XRs-C18, nr kat. A6001050X020, Harbor City, CA, USA), co umożliwiała dodatkowy rozdział analizowanych frakcji wymywanych z płytki chromatograficznej. Wymiary zastosowanej kolumny wynosiły 50 mm × 2 mm. Grubość ziarna wypełnienia kolumny wynosiła 3 µm. Analiza chromatograficzna

techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej trwała 25 minut. Dane uzyskiwane dla analizowanych próbek rejestrowano i opracowywano przy pomocy programu Varian MS Workstation 6.91.

## **2.9. Spektroskopia $^{13}\text{C}$ NMR**

Widma  $^{13}\text{C}$  NMR zostały zarejestrowane przy pomocy spektrometru NMR Bruker Avance II 400 MHz z magnesem UltraShield Plus przy częstotliwości pola magnetycznego 100 MHz (Avance UltraShield) oraz 150 MHz (Avance II UltraShield Plus). Olejki eteryczne w czystej postaci rozpuszczano w  $\text{CDCl}_3$  celem uzyskania roztworów o stężeniu ok. 10% objętościowych. TMS był używany jako wewnętrzny wzorzec odniesienia. Analizę przeprowadzono z użyciem 20 tysięcy skanowań, a następnie zwiększono liczbę skanów do 40 tysięcy, co okazało się bardzo skuteczne dla ukazania wielu dodatkowych składników mieszaniny, które występowały w próbce w niższych stężeniach.

## **2.10. Wstępne przygotowanie danych do dalszej analizy**

Wstępne przygotowanie danych do dalszej analizy ma na celu podniesienie ich jakości oraz poprawienie interpretacji otrzymanych wyników. Na każdy sygnał instrumentalny składają się trzy elementy: właściwy sygnał analityczny, szum oraz linia bazowa. Pierwszy element wnosi znaczący wkład w interpretację wyników analizy, natomiast dwa pozostałe są niepożądane. Aby poprawić jakość sygnału możemy stosować metody odnoszące się do indywidualnych obiektów macierzy danych, np. wspomnianych sygnałów instrumentalnych (metody eliminacji szumu i linii bazowej, różnego rodzaju procedury normalizacyjne, pochodne, itp.) [80].

### **2.10.1. Eliminacja tła sygnału analitycznego**

Istnieje wiele metod, które mogą być używane w celu usunięcia tła sygnału analitycznego. Wśród nich jest metoda asymetrycznych najmniejszych kwadratów z funkcją kary, *PALS*, zaproponowana przez Eilersa [81]. Jest to procedura iteracyjna,

gdzie linia bazowa  $\mathbf{b}$  jest aproksymowana, wykorzystując metodę najmniejszych kwadratów. Kluczowe założenie tej metody polega na tym, że każdy punkt sygnału ma inną wagę. Minimalizowana w trakcie estymacji linii bazowej funkcja kosztów,  $Q$ , zdefiniowana jest następująco:

$$Q = \sum_{i=1}^n w_i (x_i - b_i)^2 + \lambda (\Delta^d b_i)^2 \quad (1)$$

gdzie:

$w_i$  -  $i$ -ta waga,  $n$  - liczba punktów pomiarowych w sygnale,  $\lambda$  - tzw. parametr „kary”,  $d$  - rząd różnic  $\Delta$  elementów sygnału.

Poprawne działanie metody *PALS* zależy od właściwego doboru dwóch parametrów  $\lambda$  i  $d$ . Parametr „kary”  $\lambda$  odpowiada za gładkość linii bazowej. Im wyższa wartość  $\lambda$ , tym linia bazowa jest bardziej wygładzona. Parametr  $d$  w większości zastosowań ma wartość 2.

### 2.10.2. Usuwanie szumu z sygnału analitycznego

Do eliminacji tzw. białego szumu (szumu Gaussa) z sygnałów analitycznych można użyć różnego rodzaju filtrów cyfrowych w domenie czasu lub częstotliwości [82, 83], jak np. filtru Sawickiego-Golay'a, itp. W ciągu ostatnich lat, odszumianie sygnałów chromatograficznych przy pomocy falek stało się bardzo popularne, ponieważ w skuteczny sposób pozwala wyeliminować tzw. biały szum, występujący w sygnałach niestacjonarnych [84-86]. Chromatogramy są typowymi przykładami takich sygnałów instrumentalnych, ponieważ zawierają składowe o bardzo różnych częstotliwościach.

Transformacja falkowa przekształca sygnał za pomocą liniowej transformacji z jego pierwotnej domeny do domeny falkowej. Falki to zestaw określonych funkcji bazowych, które są ortogonalne i lokalne. Dzięki tym unikalnym własnościom są one bardzo skuteczne przy modelowaniu sygnałów niestacjonarnych, pozwalając na ich analizę na różnych poziomach rozdzielczości.



W domenie falkowej każdy sygnał jest opisany przez zbiór tzw. współczynników falkowych  $\mathbf{c}$ :

$$\mathbf{c} = \mathbf{W}^T \mathbf{x} \quad (2)$$

gdzie:

$\mathbf{W}$  - macierz zawierająca wektory bazowe w kolumnach,  $\mathbf{x}$  - sygnał analityczny.

Przetwarzanie sygnałów instrumentalnych w domenie falkowej może być bardzo efektywne, gdy do obliczeń wykorzystywany jest tzw. algorytm piramidalny, jednak można go używać jedynie do sygnałów o jednakowej długości [87]. Domena czasu sygnału jest dzielona rekurencyjnie na pół przy pomocy filtrów (*low-pass filter* i *high-pass filter*) [88]. Na każdym poziomie dekompozycji uzyskiwane są dwa zestawy współczynników falkowych, tj.  $n/2$  współczynników o niskiej częstotliwości (tzw. aproksymacji) oraz  $n/2$  współczynników o wysokiej częstotliwości (tzw. detali). Detale uzyskane z pierwszego poziomu dekompozycji sygnału zawierają informacje o szumie. Na ich podstawie możliwe jest określenie i wyeliminowanie szumu. Po usunięciu tych detali, sygnał jest przekształcany z powrotem do domeny czasu, co ostatecznie prowadzi do uzyskania sygnału oczyszczonego z szumu [86].

### 2.10.3. Nakładanie sygnałów analitycznych

Zwykle przed wykonaniem operacji chemometrycznych sygnały chromatograficzne muszą posiadać taką samą liczbę punktów pomiarowych [89]. Techniki chromatograficzne są narażone na różnego rodzaju zakłócenia instrumentalne. Zazwyczaj są one spowodowane przez zjawiska starzenia się kolumny, niezamierzone zmiany w składzie fazy ruchomej, trudności w odtwarzaniu warunków gradientu fazy ruchomej i temperatury podczas analizy itp. Z takimi problemami mamy do czynienia wówczas, gdy eksperyment prowadzony jest na szeroką skalę i analiza próbek odbywa się przez dłuższy okres czasu. Może to doprowadzić do przesunięcia pików wzdłuż osi czasu, co uniemożliwia porównanie różnych chromatogramów.

W celu pozbycia się tych niepożądanych zjawisk stosuje się techniki nakładania sygnałów analitycznych [81, 90-95]. Jak wynika z literatury metoda *COW* (ang. *Correlation Optimized Warping*) [90, 96] jest bardzo często stosowana do nakładania

sygnałów analitycznych. Przy pomocy metody *COW*, piki znajdujące się w sygnale analitycznym **P** są dopasowywane do ich odpowiedników w sygnale wzorcowym **T**. Aby osiągnąć jak najlepsze rezultaty dopasowania, współczynnik korelacji między sygnałami **P** i **T** musi być maksymalny. W metodzie tej należy zoptymalizować dwa parametry. Są to długość sekcji **N** i parametr *t* (ang. *slack parameter*). Szczegółową prezentację algorytmu *COW* można znaleźć w pracy [90].

## 2.11. Analiza czynników głównych (PCA)

Analiza czynników głównych (ang. *Principal Components Analysis*, PCA) jest metodą modelowania, kompresji i wizualizacji wielowymiarowych danych [97-100].

Zadaniem PCA jest przedstawienie danych, **X**, o *m* obiektach i *n* zmiennych, jako iloczyn dwóch nowych macierzy **T** (*m*×*f*) i **P** (*n*×*f*) (gdzie *f* < *n*), które zawierają współrzędne obiektów i parametrów na kierunkach maksymalizujących opis wariancji danych. O liczbie kolumn macierzy **T** i **P**, czyli o kompleksowości modelu PCA, decyduje chemiczny rząd macierzy **X**, który jest co najwyżej równy jej rzędowi matematycznemu. Model PCA można wyrazić następująco:

$$\mathbf{X}_{[m,n]} = \mathbf{T}_{[m,f]} \mathbf{P}_{[f,n]}^T + \mathbf{E}_{[m,n]} \quad (3)$$

gdzie:

**T** - macierz wyników, **P** - macierz wag, a **E** - macierz reszt od modelu PCA z *f* czynnikami głównymi.

Każdy kolejny czynnik główny opisuje niewyjaśnioną przez poprzednie czynniki wariancję danych i dlatego jego wkład do opisu całkowitej wariancji jest mniejszy. Kolumny **T** są ortogonalne, a kolumny **P** ortonormalne, czyli mają jednostkową długość i są ortogonalne. Biorąc pod uwagę wspomniane ograniczenia dotyczące konstrukcji czynników głównych, równanie (3) posiada jednoznaczne rozwiązanie. Z każdym czynnikiem głównym jest stowarzyszona tzw. wartość własna, *v<sub>i</sub>*. Oblicza się ją jako sumę kwadratów wartości wyników dla danego czynnika głównego.

Czynniki główne pozwalają na określenie podobieństwa między próbkami, natomiast wagi niosą informację o udziale poszczególnych zmiennych. Gdy dwie

próbki są podobne w sensie chemicznym, to są one położone blisko siebie na projekcji wyników [80, 101].

### **3. Porównanie efektywności wyodrębniania frakcji lotnej z różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.) przy użyciu czterech technik izolacyjnych**

W dzisiejszych czasach identyfikacja różnych gatunków roślin jest niezwykle potrzebna, jednakże jest ona zarazem bardzo trudna. Może być wykonywana różnymi metodami. Najstarsze z nich to badania makroskopowe, następnie nadszedł czas na badania mikroskopowe, a obecnie stosuje się do tego celu analizę składu chemicznego roślin [102]. Ostatnio nowoczesne metody analityczne pozwalają na coraz dokładniejsze określenie składu chemicznego materiału roślinnego oraz na chemotaksonomiczną klasyfikację gatunków, czyli na klasyfikację organizmów ze względu na ich skład chemiczny.

Wiele leków ziołowych w przypadku przedawkowania lub niewłaściwego stosowania może spowodować poważne skutki uboczne. Ponadto obecny renesans na skalę światową zastosowania leków ziołowych doprowadził do wzrostu popytu na te preparaty i do jednoczesnego spadku ich jakości. Potrzeba ustanowienia systematycznego podejścia do standaryzacji surowców i preparatów ziołowych oraz zaprojektowanie doskonalszych metod służących do tego celu wydają się niezbędne [103]. Różne metody mogą być wykorzystywane do fitochemicznej standaryzacji surowców ziołowych, na przykład fingerprintowanie chromatograficznych profili stężeniowych, czy ilościowe oznaczanie markerów chemotaksonomicznych, zawartych w roślinach. Chromatogram typu „fingerprint” wyraża skład danej próbki przy pomocy charakterystycznego rozłożenia komponentów w chromatogramie analitycznym.

Metabolomika to dziedzina nauki zajmująca się badaniem zestawu wszystkich metabolitów obecnych w organizmie, tkance czy komórce - metabolomu. Jest zaliczana obok genomiki, transkryptomiki i proteomiki do biologii systemowej, która zajmuje się badaniem złożonych oddziaływań występujących w systemach biologicznych. Metabolomika zajmuje się niskocząsteczkowymi metabolitami pochodzącymi z próbek biologicznych, np. metabolicznymi półproduktami, hormonami oraz innymi metabolitami wtórnymi [104, 105]. Szczególnie od początku lat 80-tych XX wieku technika chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS) została

szeroko zastosowana do metabolomicznego badania roślin, zwierząt i ludzi, jak również do badań toksykologicznych, czy odkrywania nowych chemotaksonomicznych biomarkerów. Technika GC-MS znakomicie nadaje się do analizy związków niepolarnych, na przykład syntetycznych związków organicznych i hydrofobowych produktów pochodzenia naturalnego, przez co jest powszechnie wykorzystywana do tego celu.

Podstawowym zadaniem badawczym niniejszej analizy było porównanie efektywności wyodrębniania frakcji lotnej z pięciu różnych gatunków *Salvia* L. (*S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba* i *S. nemorosa*) przy użyciu trzech technik izolacyjnych. Pierwszą z nich była desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C i 80°C sprzężona z techniką GC/MS (*Head-Space/GC-MS*), znakomicie nadająca się do tego typu analiz i opisana w wielu publikacjach na ten temat. Kolejne techniki to destylacja z parą wodną w aparacie Derynga o zamkniętym obiegu wody polecana przez Farmakopeę Polską [24] jako podstawowa metoda wyodrębniania substancji lotnych oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (*Accelerated Solvent Extraction - ASE*), dla której warunki analizy zaczerpnięto z aplikacji firmy Dionex [79] – producenta aparatury, w której wykonywano wspomnianą ekstrakcję. Dalszym etapem badań było porównanie składu lotnych frakcji tych gatunków, pochodzących z dwóch sezonów wegetacyjnych (lata 2007 i 2008).

Materiał roślinny wykorzystany w prezentowanych badaniach pochodził z Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Porównanie czterech technik wyodrębniania lotnych związków z surowego materiału roślinnego zostało dokonane na podstawie wyników odnoszących się do próbek szalwii pochodzącej z 2007. Uzyskane wyniki zestawiono w tab. 4.

Tab.4. Porównanie efektywności wyodrębniania frakcji lotnej z pięciu gatunków *Salvia* L. (*S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba* i *S. nemorosa*) przy użyciu czterech technik izolacyjnych:

*HS-70*, *HS-80* - desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C i 80°C (*Head-Space*), czas wygrzewania 15 min;  
*Deryng* - destylacja z parą wodną w aparacie Derynga, 50g suszonej rośliny z dodatkiem 400 mL wody ogrzewano przez 3 godz.  
*ASE* - ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa; rozpuszczalnik: eter naftowy, temperatura pieca 105°C, ciśnienie 6,67 Mpa, wstępne ogrzewanie próbki 10 min, ogrzewanie próbki po dodaniu rozpuszczalnika 5 min). Względna ilość lotnego związku wyizolowanego najbardziej efektywną metodą ekstrakcji jest oznaczona jako 1. Wyniki uzyskane mniej efektywnymi metodami odniesiono w stosunku do najskuteczniejszej metody.

Związek lotny	α-Pinen	Kamfien	β-Pinen	β-Mircen	o-Cymen	Limonen	β-Felandren	β-trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	1-Terpinen	p-Menta-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Octan bornyli	β-Chamigren	Cadina-3,9-dien	Murolen	Izokariofilen	Kariofilen	Liczba zidentyfikowanych związków
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
t <sub>R</sub> [min]	10,97	11,75	12,20	12,25	13,15	13,26	13,32	13,36	13,50	13,91	13,95	14,59	15,12	15,35	15,47	16,11	16,65	18,84	21,60	22,43	23,31	21,70	22,53	
<i>Salvia lavandulifolia</i>																								
HS-70	1		1	1				0,60	1	1		0,21	0,20		1	0,90	0,22	0,14	0,02	0,09				14
HS-80	0,14		0,72	0,96				1	0,90			1	0,29		0,48	0,06	0,07	0,62	0,54	0,39				13
Deryng	0,91		0,23	0,28				0,90	0,95				1		0,35		1	1	1	1				11
ASE	0,11							0,27				0,22				1			0,08	0,12				6
<i>Salvia staminea</i>																								
HS-70	1	1	1			1			1	1			1	1					0,25	0,33				10
HS-80	0,56	0,71	0,59			0,28													0,36	0,13				6
Deryng	0,40		0,81			0,55	1	1	0,20				0,20		1		1		1		1	1	1	13
ASE																			0,24	0,15				2
<i>Salvia hians</i>																								
HS-70	1	1	1			1			1				1		0,20			1	1	1	1			11
HS-80			0,14			0,10													0,07	0,15				4
Deryng			0,18				1		0,20						1				0,65	0,60	1			7
ASE																								0
<i>Salvia triloba</i>																								
HS-70									1						1	0,40								3
HS-80			1					1					0,89		0,94	0,75	1		1	1				8
Deryng	1		0,17						0,95				0,75		0,87	0,70	0,50	1				1	1	10
ASE								0,37				1			0,38	1			0,33	0,44				6
<i>Salvia nemorosa</i>																								
HS-70	1	1	0,90		0,83					1		1				1			0,50	1	1			11
HS-80	0,27		1		1								0,04			0,71			0,28					5
Deryng										0,20									1					2
ASE																			0,21					1

Z porównania zamieszczonego w tab. 4. wynika, że w przypadku trzech (z pięciu) badanych gatunków szalwii, desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C pozwoliła zidentyfikować największą liczbę lotnych związków (czternaście dla *S. lavandulifolia* oraz jedenaście dla *S. hians* i *S. nemorosa*). Dodatkowo desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w 70°C okazała się skuteczną metodą w ilościowym oszacowaniu frakcji lotnej. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C była mniej skuteczna (zidentyfikowano trzynaście lotnych związków dla *S. lavandulifolia*, pięć związków lotnych dla *S. nemorosa* i cztery dla *S. hians*). Ponadto podwyższenie temperatury z 70 do 80°C spowodowało widoczne pogorszenie rozdzielczości na chromatogramach, co miało negatywny wpływ zarówno na identyfikację, jak i na ilościowe oszacowanie badanych związków lotnych.

Destylacja z parą wodną w aparacie Derynga przyniosła identyfikację trzynastu związków dla *S. staminea*, jedenastu związków dla *S. lavandulifolia*, dziesięciu związków dla *S. triloba*, siedmiu związków dla *S. hians* i tylko dwóch związków dla *S. nemorosa*. Frakcja otrzymana metodą destylacji z parą wodną jest bogatsza w związki mniej lotne, natomiast metoda *head-space* pozwala oznaczyć składniki bardziej lotne.

Ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE) z zastosowaniem eteru naftowego okazała się najmniej skuteczna. W próbkach przygotowanych tą metodą zidentyfikowano zaledwie sześć związków lotnych dla *S. lavandulifolia* i *S. triloba*, dwa związki lotne dla *S. staminea*, jeden związek dla *S. nemorosa*, a dla *S. hians* nie zidentyfikowano żadnego związku lotnego.

Sezonowe porównanie składu jakościowego i ilościowego frakcji lotnej pochodzącej z pięciu różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.) przedstawiono w tab. 5-9, w których oszacowano względny procentowy udział zidentyfikowanych związków względem całkowitej frakcji lotnej. Pogrubione czcionki w tabelach pokazują chemotaksonomiczne markery oraz wskaźniki chemotaksonomiczne analizowanych gatunków szalwii.

Tab.5. Porównanie względnego udziału procentowego (%) zidentyfikowanych związków w stosunku do całości frakcji lotnej zawartej w *Salvia lavandulifolia* zebranej w 2007 i 2008, przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Pogrubiona czcionką zaznaczono marker chemotaksonomiczny ( $\beta$ -mircen) oraz wskaźniki chemotaksonomiczne ( $\beta$ -trans-ocymen i tujon)

Związek lotny	$\alpha$ -Pinen	Kamfien	$\beta$ -Pinen	$\beta$ -Mircen	o-Cymen	Limonen	$\beta$ -Felandren	$\beta$ -trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	1-Terpinen	p-Menta-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Octan bornylu	$\beta$ -Chamigren	Cadina-3,9-dien	Mircen	Izokamfien	Kamfien
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
$t_R$ [min]	10,97	11,75	12,20	12,25	13,15	13,26	13,32	13,36	13,50	13,91	13,95	14,59	15,12	15,35	15,47	16,11	16,65	18,84	21,60	22,43	23,31	21,70	22,53
Względny udział procentowy (%) w stosunku do całości frakcji lotnej																							
HS-70	2007	7,22	16,15	2,82				+	21,33	1,74		0,09	2,47		13,08	19,03	3,77	1,63	0,15	1,02			
	2008	5,17	10,70	6,34				12,92	15,04			0,54	2,23		11,99	13,43	4,23	1,42	1,73	3,76			
HS-80	2007	8,09	10,27	8,28				+	14,00	0,21		0,06	9,67		5,67	10,37	7,18	5,46	1,42	4,33			
	2008	5,99	6,74	6,55				12,04	12,12	1,40		1,40	9,32		9,01	9,04		0,41		1,70			
Deryng	2007	4,13	2,25	1,08				12,70		0,28			9,22		2,88	9,02		7,40	3,26	7,64			
	2008	7,08	5,10	5,52				14,97		0,61			10,80		5,17	11,27		1,77	0,42	8,17			
ASE	2007	1,80	0,46					13,44					7,52			49,95			0,85	3,30			
	2008	0,40	0,47					9,41					19,85			55,94			0,25	3,73			

+ - powyżej progu wykrywalności (LOD), ale poniżej progu oznaczalności (LOQ)

Tab.6. Porównanie względnego udziału procentowego (%) zidentyfikowanych związków w stosunku do całości frakcji lotnej zawartej w *Salvia staminea* zebranej w 2007 i 2008, przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Pogrubioną czcionką zaznaczono wskaźnik chemotaksonomiczny (tujenon)

Związek lotny	α-Pinen	Kamfen	β-Pinen	β-Mircen	o-Cymen	Limonen	β-Felandren	β-trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	1-Terpinen	p-Menta-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Octan bornylu	β-Chamigren	Cadina-3,9-dien	Murolen	Izokamofilen	Karofilen
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
t <sub>R</sub> [min]	10,97	11,75	12,20	12,25	13,15	13,26	13,32	13,36	13,50	13,91	13,95	14,59	15,12	15,35	15,47	16,11	16,65	18,84	21,60	22,43	23,31	21,70	22,53
Względny udział procentowy (%) w stosunku do całości frakcji lotnej																							
HS-70	2007	10,09	4,86	5,23		15,68			3,58	2,30			3,33	<b>0,69</b>					2,98	1,41			
	2008	3,72	1,44	6,47		6,23			3,88				2,51	<b>1,64</b>					6,44	3,49			
HS-80	2007	8,75	2,47	5,39		6,24			1,12	0,29									8,39	2,19			
	2008	5,28		11,50		11,62			5,85				7,01	<b>1,49</b>					9,38	4,60			
Deryng	2007	2,64		3,05		5,57		3,93	0,54				0,41	<b>0,30</b>			0,97		10,21	6,30			
	2008	6,36		0,11		0,11			4,47										12,08	6,39			
ASE	2007																		13,17	4,70			
	2008																		12,11	3,90			



Tab.7. Porównanie względnego udziału procentowego (%) zidentyfikowanych związków w stosunku do całości frakcji lotnej zawartej w *Salvia hians* zebranej w 2007 i 2008, przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Pogrubioną czcionką zaznaczono wskaźnik chemotaksonomiczny (tujon)

Związek lotny	α-Pinen	Kamfen	β-Pinen	β-Mircen	o-Cymen	Limonen	β-Felandren	β-trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	1-Terpinen	p-Menta-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Octan bornylu	β-Chamigren	Cadina-3,9-dien	Murolen	Izokariofilen	Kariofilen
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
t <sub>R</sub> [min]	10,97	11,75	12,20	12,25	13,15	13,26	13,32	13,36	13,50	13,91	13,95	14,59	15,12	15,35	15,47	16,11	16,65	18,84	21,60	22,43	23,31	21,70	22,53
Względny udział procentowy (%) w stosunku do całości frakcji lotnej																							
HS-70	2007	1,26	2,67	3,13		9,95			1,71		1,25		0,98		<b>0,50</b>			6,00	22,05	2,61	2,57		
	2008	0,63	1,95	3,18		11,10			6,02		0,12		9,12		<b>0,59</b>	11,60		1,16	8,52	10,16	0,69		
HS-80	2007	0,21		1,09		3,39			0,26				0,38		<b>0,29</b>	1,14		0,26	3,72	1,71	0,80		
	2008	0,75		2,86		14,21			7,43				5,44		<b>0,85</b>	13,55		0,58	3,28	3,58	1,60		
Deryng	2007			0,29			8,93		8,14						<b>0,54</b>				9,80	1,50	14,33		
	2008	8,95													<b>0,04</b>				8,26	1,22			
ASE	2007																		2,55	1,20			
	2008																		3,46	1,31			

Tab. 8. Porównanie względnego udziału procentowego (%) zidentyfikowanych związków w stosunku do całości frakcji lotnej zawartej w *Salvia triloba* zebranej w 2007 i 2008, przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Pogrubiona czcionką zaznaczono wskaźnik chemotaksonomiczny (tujon)

Związek lotny	α-Pinen	Kamfen	β-Pinen	β-Mircen	o-Cymen	Limonen	β-Felandren	β-trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	γ-Terpinen	p-Mentol-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Ocetan bornyłu	β-Chamazulen	Cadin-3,9-dien	Murolen	Izokamfolen	Kamfolen
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
t <sub>R</sub> [min]	10,97	11,75	12,20	12,25	13,15	13,26	13,32	13,36	13,50	13,91	13,95	14,59	15,12	15,35	15,47	16,11	16,65	18,84	21,60	22,43	23,31	21,70	22,53
Względny udział procentowy (%) w stosunku do całości frakcji lotnej																							
HS-70	2007	11,59	0,28						23,40						17,81	17,75			0,38	0,21			
	2008	2,45	2,04						16,62				36,23		9,47	17,61			2,88	1,78			
HS-80	2007	7,41	4,23				14,71						11,05		10,91	11,18		2,52	8,53	6,22			
	2008	5,72	6,28						17,20				14,28		10,83	12,72	1,65	0,27	7,63	4,82			
Deryng	2007	4,22	0,47						11,09				7,41		7,96	8,14	4,89	4,38	10,99	8,80			
	2008	1,21	0,93						11,98				8,22		8,16		4,21	0,69	12,39	9,87			
ASE	2007												24,92		8,78	28,89			5,55	5,77			
	2008												38,41		3,33	29,73			8,09	7,35			

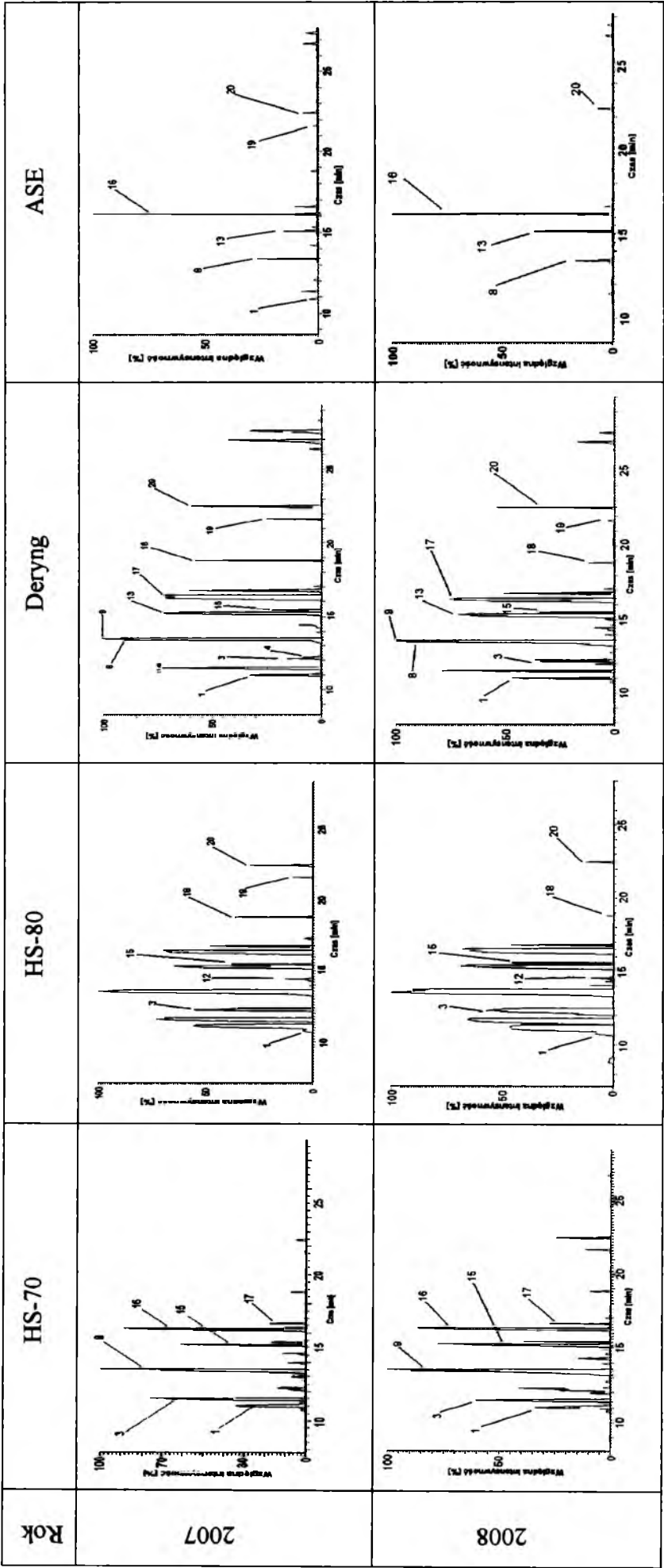
Tab.9. Porównanie względnego udziału procentowego (%) zidentyfikowanych związków w stosunku do całości frakcji lotnej zawartej w *Salvia nemorosa* zebranej w 2007 i 2008, przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE)

Związek lotny	α-Pinen	Kamfēn	β-Pinen	β-Mircen	o-Cymen	Limonen	β-Felandren	β-trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	1-Terpinen	P-Menta-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Octan bornylu	β-Chamigren	Cadina-3,9-dien	Murolen	Izokamiofilen	Kariofilien
Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
t <sub>R</sub> [min]	10,97	11,75	12,20	12,25	13,15	13,26	13,32	13,36	13,50	13,91	13,95	14,59	15,12	15,35	15,47	16,11	16,65	18,84	21,60	22,43	23,31	21,70	22,53
Względny udział procentowy (%) w stosunku do całości frakcji lotnej																							
HS-70	2007	8,98	13,74	2,20						7,44	+	2,70	5,52			1,23			6,88	1,17			
	2008	1,97		5,28								0,30	5,50			7,18			12,20	14,33	0,39		
HS-80	2007	1,20		3,57								0,36	15,12			1,74			6,22	2,39			
	2008	0,34		1,31									0,90			0,64			7,08	1,88			
Deryng	2007									1,15									20,48				
	2008									0,61									9,24				
ASE	2007																		9,68				
	2008																		4,61				

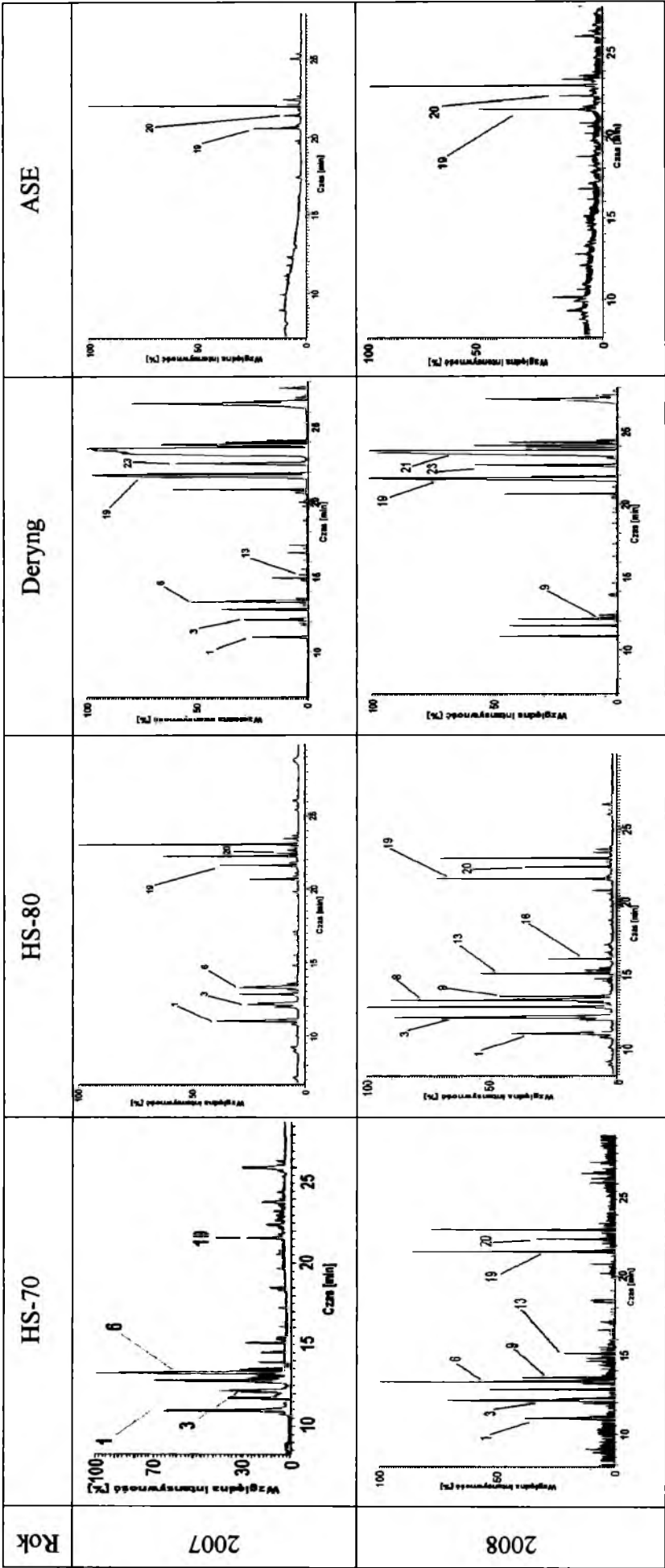
+ - powyżej progu wykrywalności (LOD), ale poniżej progu oznaczalności (LOQ)

Na rys. 15-19 zamieszczono chromatogramy pięciu badanych gatunków szalwii (*S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba* i *S. nemorosa*), pochodzących z różnych okresów wegetacyjnych (lata 2007 i 2008). Profile stężeniowe porównano sezonowo, jak również pod względem różnych technik wyodrębniania frakcji lotnej z suszonego materiału roślinnego.

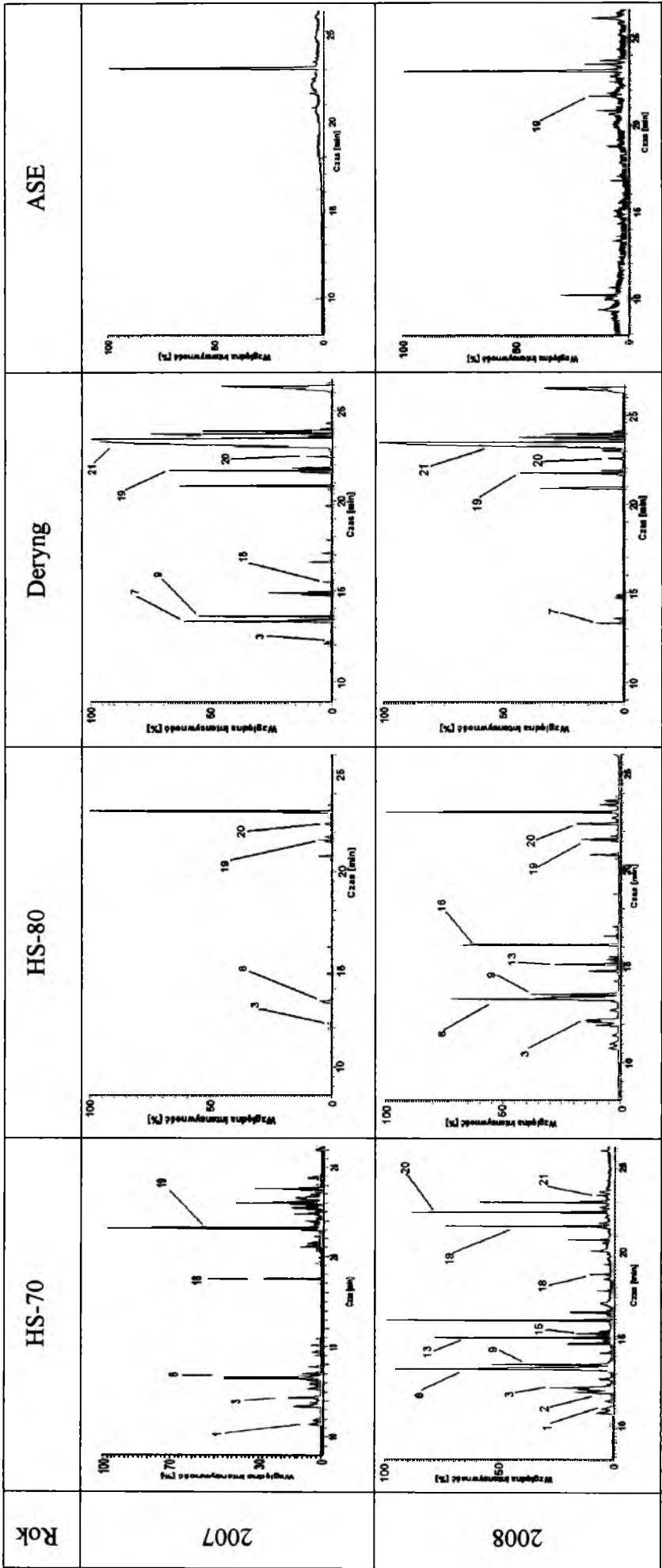
Rys.15. Porównanie chromatogramów lotnej frakcji *Salvia lavandulifolia* zebranej w 2007 i 2008 przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Numeracja na chromatogramach odpowiada związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.4.



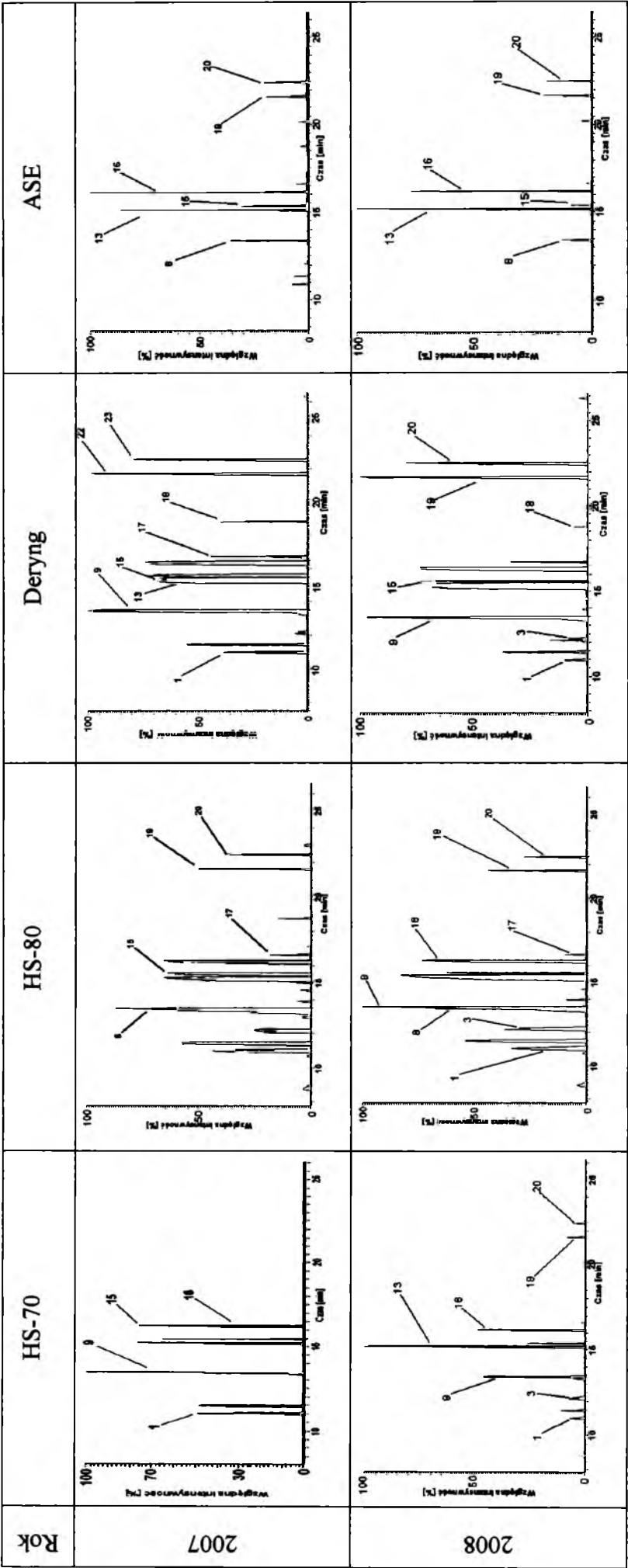
Rys.16. Porównanie chromatogramów lotnej frakcji *Salvia staminea* zebranej w 2007 i 2008 przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Numeracja na chromatogramach odpowiada związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.4.



Rys.17. Porównanie chromatogramów lotnej frakcji *Salvia hians* zebranej w 2007 i 2008 przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Numeracja na chromatogramach odpowiada związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.4.

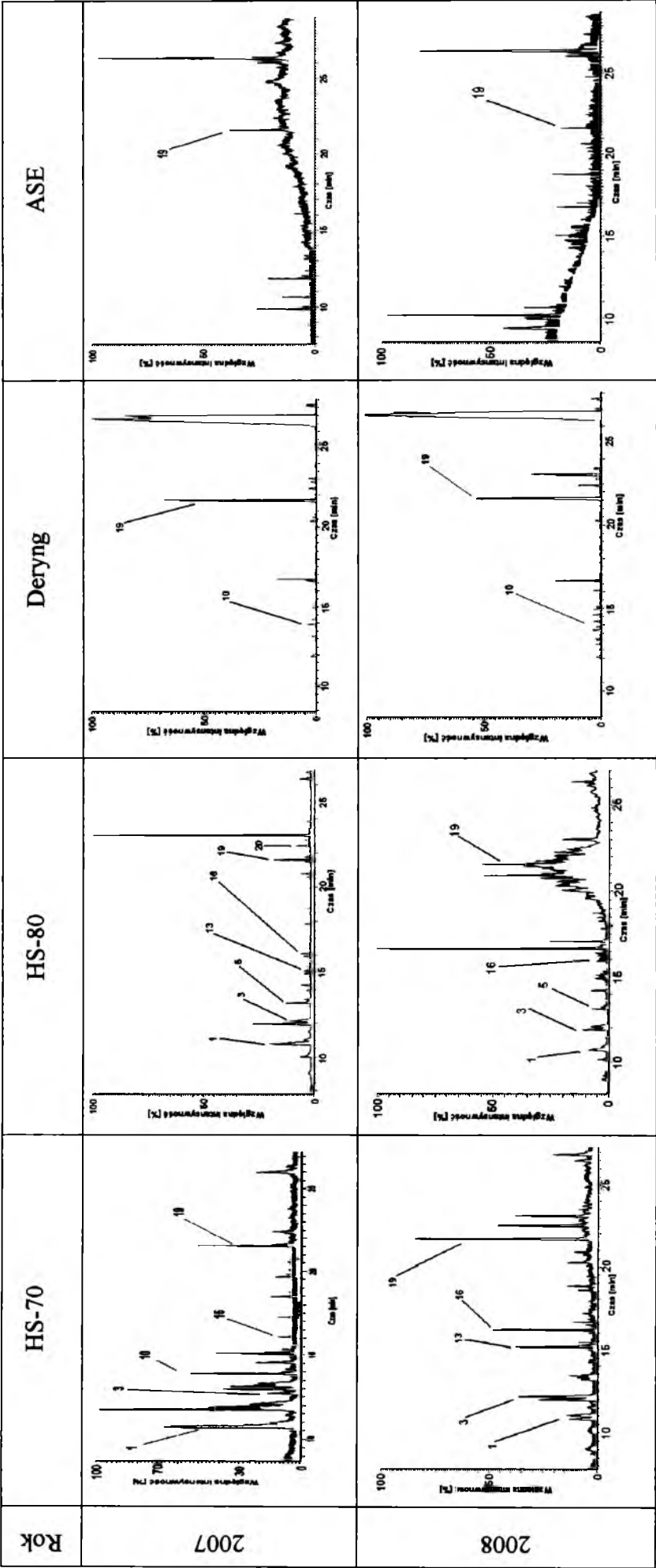


Rys. 18. Porównanie chromatogramów lotnej frakcji *Salvia triloba* zebranej w 2007 i 2008 przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Numeracja na chromatogramach odpowiada związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab. 4.





Rys. 19. Porównanie chromatogramów lotnej frakcji *Salvia nemorosa* zebranej w 2007 i 2008 przy pomocy różnych metod ekstrakcji: desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C (HS-70); desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 80°C (HS-80); destylacja z parą wodną w aparacie Derynga (Deryng) oraz ciśnieniowa ekstrakcja cieczowa (ASE). Numeracja na chromatogramach odpowiada związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.4.



Porównując pod względem jakościowym skład chemiczny frakcji lotnej badanych gatunków szalwii pochodzących z dwóch okresów wegetacyjnych, 2007 i 2008, wyizolowanej przy użyciu tej samej techniki eksperymentalnej, dochodzimy do wniosku, że jest on podobny (rys.15-19). Należy jednak zauważyć, że pary chromatogramów próbek pochodzących z roku 2007 i 2008 nie są identyczne, choć materiał roślinny był przechowywany w ten sam sposób. Jedną z istotnych różnic między materiałem roślinnym pochodzącym z dwóch różnych lat jest odmienny czas ich zbioru (sierpień 2007 r. i październik 2008 r.). Innym ważnym czynnikiem są nieuniknione różnice w warunkach pogodowych między dwoma sezonami wegetacyjnymi. Analogiczne wnioski można wyciągnąć z ilościowego sezonowego porównania wydajności metod ekstrakcji lotnych związków z tego samego gatunku szalwii (tab. 5-9).

Dokonując analizy chemotaksonomicznej stwierdzono, że w *S. lavandulifolia* jest obecny  $\beta$ -mircen jako marker chemotaksonomiczny oraz  $\beta$ -trans-ocymen i tujon jako wskaźniki chemotaksonomiczne. W *S. staminea* stwierdzono obecność tujenonu, natomiast w *S. hians* i *S. triloba* zidentyfikowano tujon jako wskaźnik chemotaksonomiczny. Wydaje się zatem, że chemotaksonomia gatunków szalwii może być oparta na związkach frakcji lotnej występujących w postaci markerów i wskaźników chemotaksonomicznych.

Na podstawie powyższych wyników można sformułować następujące wnioski:

- Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C była najskuteczniejszą metodą wyodrębniania frakcji lotnej z materiału roślinnego. Podniesienie temperatury do 80°C spowodowało pogorszenie separacji badanych związków, co niewątpliwie wywarło negatywny wpływ na ich identyfikację oraz ilościowe oszacowanie.
- Dzięki destylacji z parą wodną w aparacie Derynga można otrzymać olejki bogatsze w składniki mniej lotne, natomiast metoda *head-space* pozwala oznaczyć składniki bardziej lotne. Pełny obraz składu frakcji lotnej materiału roślinnego dają te dwie metody.
- *S. lavandulifolia* okazała się gatunkiem, w którym zidentyfikowano najwięcej lotnych związków przy pomocy prawie wszystkich porównywanych metod ekstrakcji (z wyjątkiem ASE z zastosowaniem eteru naftowego, która okazała się metodą odpowiednią wyłącznie dla roślin zawierających duże ilości olejków

eterycznych). Wizualizacja chromatogramów pokazanych na rys. 15-19 dodatkowo potwierdza słuszność niniejszego wniosku.

- Sezonowe porównanie składu lotnej frakcji pochodzącej z pięciu różnych gatunków szalwii zebranych w odmiennych sezonach wegetacyjnych, potwierdziło obecność markerów i wskaźników chemotaksonomicznych w niektórych gatunkach szalwii. Może to być przydatne do celów klasyfikacji roślin ze względu na ich skład chemiczny [106].

#### 4. Analiza chromatograficzna dwudziestu gatunków szalwii (*Salvia sp.*) techniką HS-GC/MS

Dwadzieścia gatunków szalwii (*Salvia sp.*), zebranych w sierpniu 2007 roku, a pochodzących z Ogrodu Roślin Leczniczych Katedry Farmakognozji Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, porównano pod względem składu lotnej frakcji organicznej, który przedstawiono w postaci chromatograficznych „fingerprintów”. Analiza została przeprowadzona techniką chromatografii gazowej połączoną z początkową desorpcją z fazy nadpowierzchniowej (*Head-Space GC/MS*) bezpośrednio z suszonego materiału roślinnego. Praca ta miała na celu znalezienie podobieństw i różnic w składzie chemicznym lotnej frakcji organicznej pochodzącej z poszczególnych gatunków, jak również wytypowanie markerów chemotaksonomicznych dla konkretnych gatunków szalwii [107].

Zidentyfikowane lotne związki zestawiono w Tab. 10. Analizę otrzymanych wyników przeprowadzono metodą *SIM* (*Simple Ion Monitoring*). Obróbka ta polegała na wyszukiwaniu przez bibliotekę *NIST* sprzężoną z programem *X-Calibur* w całym zakresie widma charakterystycznych jonów danej substancji. Posiłowano się ponadto chromatogramami komercyjnych olejków eterycznych o zdefiniowanym składzie (producent *Apotheca Pacis*, Rybnik), a mianowicie olejkiem sosnowym, miętowym, eukaliptusowym i jałowcowym, co pomogło w przyporządkowaniu czasów retencji oznaczanym składnikom frakcji lotnej.

Tab.10. Identyfikacja składników lotnych frakcji zawartych w dwudziestu gatunkach szalwii przy pomocy HS-GC/MS wraz z czasami retencji i względną oceną procentową udziału tych składników w całkowitej frakcji lotnej

	$\alpha$ -Pinen	Kamfen	$\beta$ -Pinen	$\beta$ -Mircen	$\alpha$ -Cymen	Limonen	$\beta$ -Felandren	$\beta$ -trans-Ocymen	Eukaliptol	cis-Ocymen	$\alpha$ -Terpinen	p-Menta-1,4-dien	Tujol	Tujenon	Tujon	Kamfora	Borneol	Ocetan bornylu	$\beta$ -Chamigren	Cadina-3,9-dien	Mircen	Izokamiofilen	Kariofilen
$t_R$ [min]	10.97	11.75	12.20	12.25	13.15	13.26	13.32	13.36	13.50	13.91	13.95	14.59	15.12	15.35	15.47	16.11	16.65	18.84	21.60	22.43	23.31	21.70	22.53
	Względny udział procentowy (%) w stosunku do całości frakcji lotnej																						
<i>S. azurea</i>	0.48	1.99	2.69			13.92			3.24	2.27	+		1.79		0.94				5.46	2.76	4.55		
<i>S. lavandulifolia</i>	7.22		16.15	2.82				++	21.33	1.74	+	2.47			13.08	19.03	3.77	1.63	0.15	1.02			
<i>S. verticillata</i>	10.72	2.39	2.49			5.85	+		0.80	1.54	+	2.06	2.18			5.23	0.53	0.60	2.17	2.33	1.60		
<i>S. pratensis</i>	1.32	17.42	2.47			2.35			3.39			+	9.11			3.06	+		1.87	2.46	1.29		
<i>S. staminea</i>	10.09	4.86	5.23			15.68			3.58	2.30	+		3.33	0.69					2.98	1.41			
<i>S. deserta</i>	35.35	4.01	13.02			7.45						3.59	2.79						0.44				
<i>S. cadmica</i>	1.72	14.91								2.42	+		8.98			2.45			25.26				
<i>S. forskaohlei</i>	6.94	5.97	55.79			9.07					1.01	3.09	3.21			0.88			1.80	0.80			
<i>S. sclarea</i>		23.36						1.63				+	12.31			2.74			3.63	+			
<i>S. canariensis</i>	16.42	0.02	4.84		0.01			18.97			+							22.49	14.78		0.03		
<i>S. hians</i>	1.26	2.67	3.13			9.95			1.71		1.25		0.98		0.50			6.00	22.05	2.61	2.57		
<i>S. triloba</i>	11.59								23.40						17.81	17.75							
<i>S. glutinosa</i>	+	15.95	11.97			10.50					+		7.02			1.65		2.10	5.58	3.47	+		
<i>S. nemorosa</i>	8.98	13.74	2.20							7.44	+	2.70	5.52			1.23			6.88	1.17	+		
<i>S. tesquicola</i>	9.54	16.91	3.15								8.05	3.02	6.15			+			3.42	+			
<i>S. amplexicaulis</i>	2.03	24.00	+					+				+	7.63			+			8.50				
<i>S. atropatana</i>	+	5.74	2.45			4.12			3.26				1.85	+					0.90				
<i>S. stepposa</i>	2.88	17.26	2.77		1.88						6.77		8.42			2.66			3.39	+	+		
<i>S. iurisiicii</i>	+	12.53	+						1.46				14.75	6.20		6.04			+	+	+		
<i>S. officinalis</i>	0.02	+	0.40						23.72					17.52		18.22	2.42	0.22				7.19	4.91

+ - powyżej progu wykrywalności (LOD), ale poniżej progu oznaczalności (LOQ)

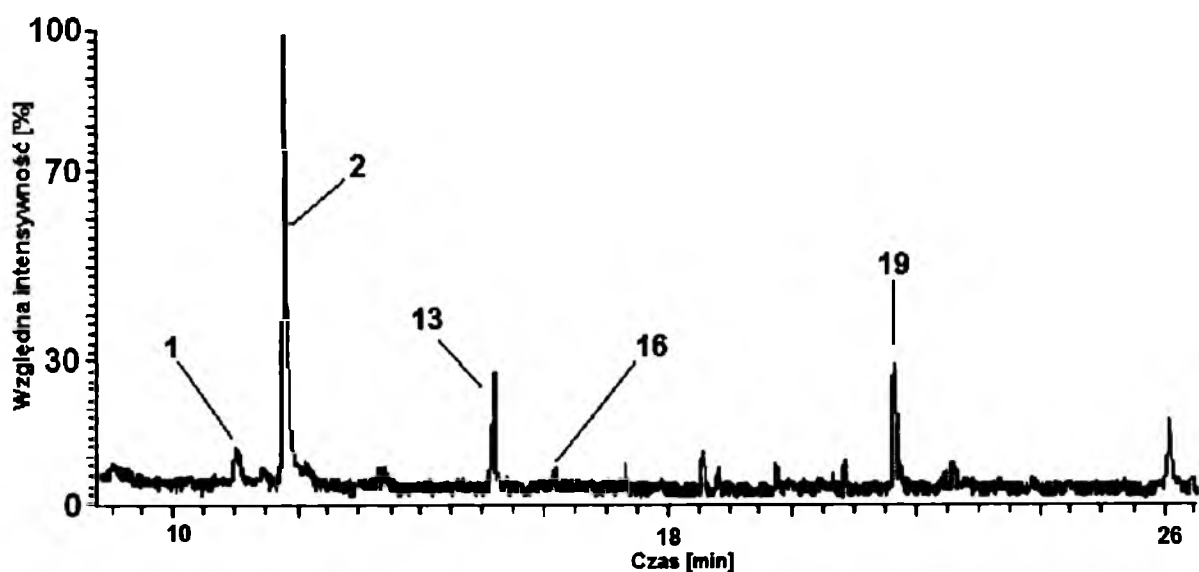
++ - brak pełnego rozdziálu

Stwierdzono, że siedem związków występuje w większości badanych gatunków szalwii. Są to następujące związki:  $\alpha$ -pinen (obecny w 19 gatunkach), kamfen (obecny w 18 gatunkach),  $\beta$ -pinen (obecny w 17 gatunkach), tujol (obecny w 16 gatunkach), kamfora (obecna w 14 gatunkach),  $\beta$ -chamigren (obecny w 18 gatunkach) oraz cadina-3,9-dien (obecny w 13 gatunkach).

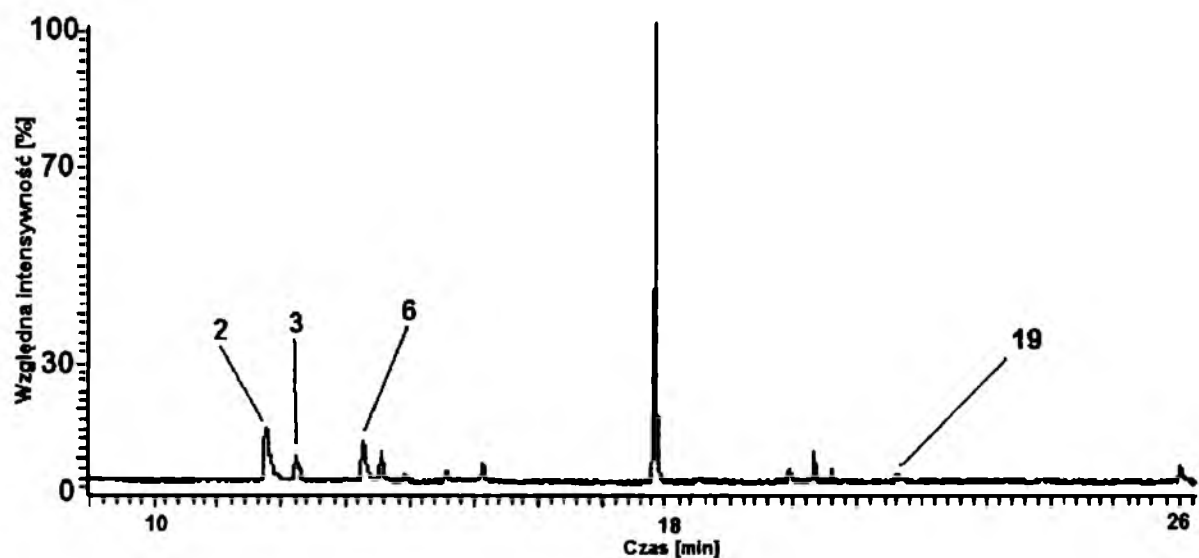
Zgodnie z definicją, chromatogram typu „fingerprint” wyraża skład danej próbki przy pomocy charakterystycznego rozłożenia komponentów w chromatogramie analitycznym [108].

Chromatograficzne „fingerprinty” są bardzo popularne i często stosowane w badaniach próbek pochodzenia naturalnego ze względu na ich złożony skład oraz bardzo ograniczoną dostępność substancji wzorcowych. Metoda ta została powszechnie wprowadzona i zaakceptowana m.in. przez Światową Organizację Zdrowia (*WHO - World Health Organization*), Agencję ds. Żywności i Leków (*FDA - Food and Drug Administration*), czy Europejską Agencję Leków (*EMA - European Medicines Agency*), powołaną przez Unię Europejską do koordynacji, oceny i nadzoru produktów leczniczych [109].

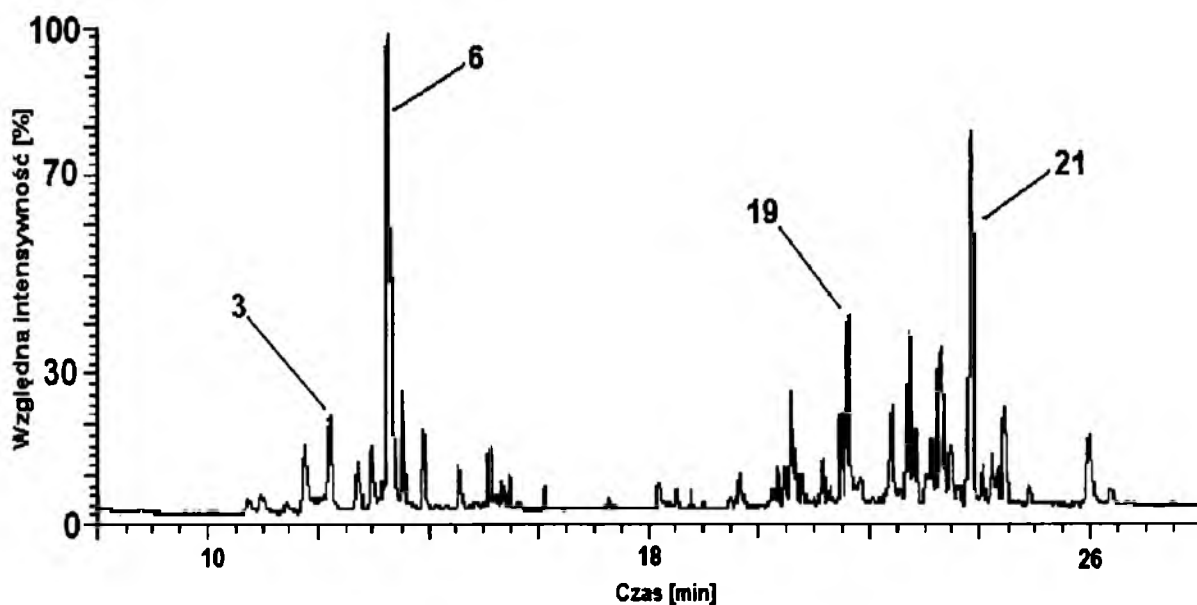
Chromatogramy gazowe analizowanych gatunków szalwii są wyraźnie zróżnicowane, co można zaobserwować na rys. 20-39. Czasy retencji składników lotnych frakcji mieszczą się w dość szerokim przedziale od 8 do 27 minut. Dla większości badanych gatunków (*S. azurea*, *S. verticillata*, *S. pratensis*, *S. staminea*, *S. cadmica*, *S. sclarea*, *S. canariensis*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa* i *S. tesquicola*) lotne składniki organiczne pojawiają się na chromatogramach w szerokim zakresie czasów retencji. Niektóre gatunki (*S. lavandulifolia*, *S. deserta*, *S. forskahlei*, *S. triloba*, *S. atropatana*, *S. stepposa* i *S. jurisicii*) są bogate w związki charakteryzujące się niskimi czasami retencji, podczas gdy *S. hians* jest bogata w związki, które stosunkowo późno opuszczają kolumnę chromatograficzną.



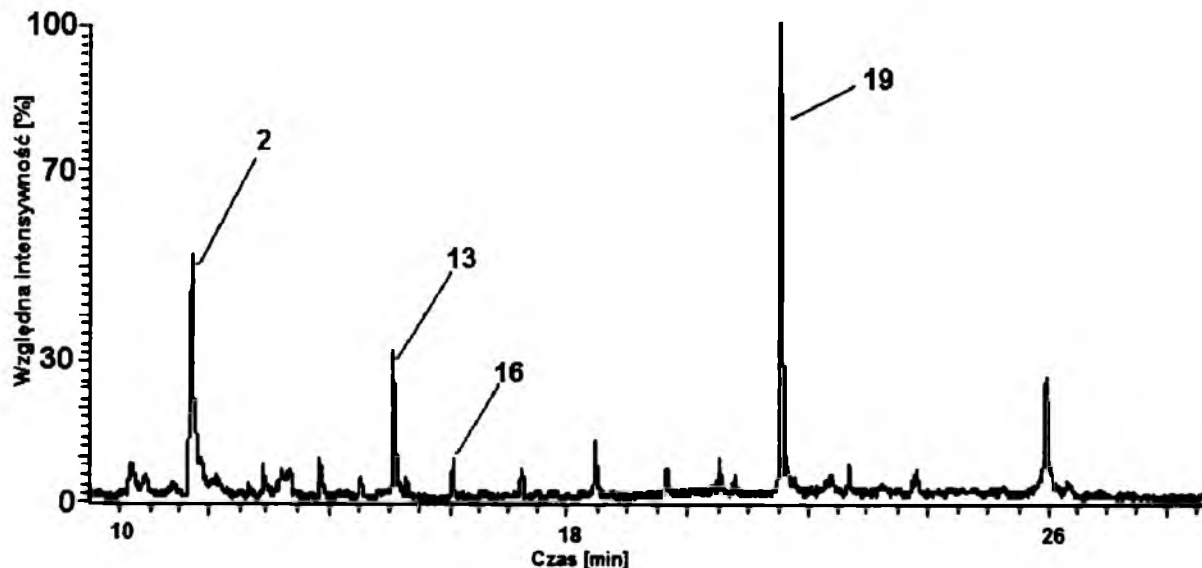
Rys.20. Chromatogram lotnej frakcji *S. amplexicaulus* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



Rys.21. Chromatogram lotnej frakcji *S. atropatana* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.

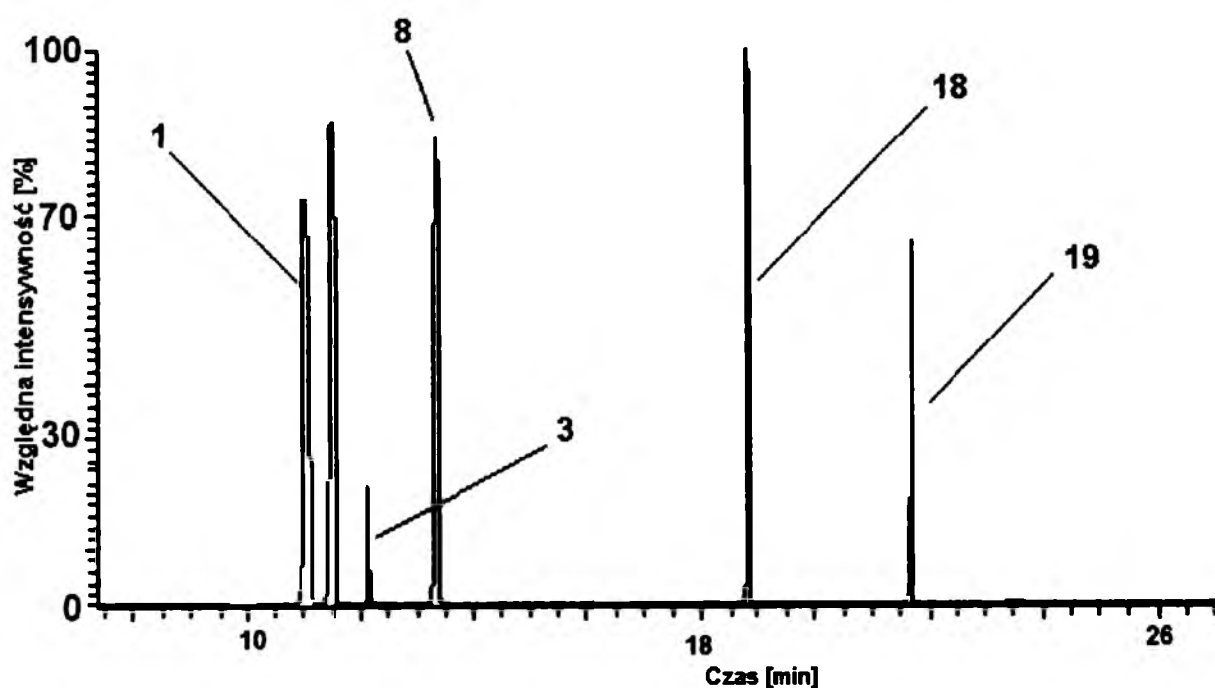


Rys.22. Chromatogram lotnej frakcji *S. azurea* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.

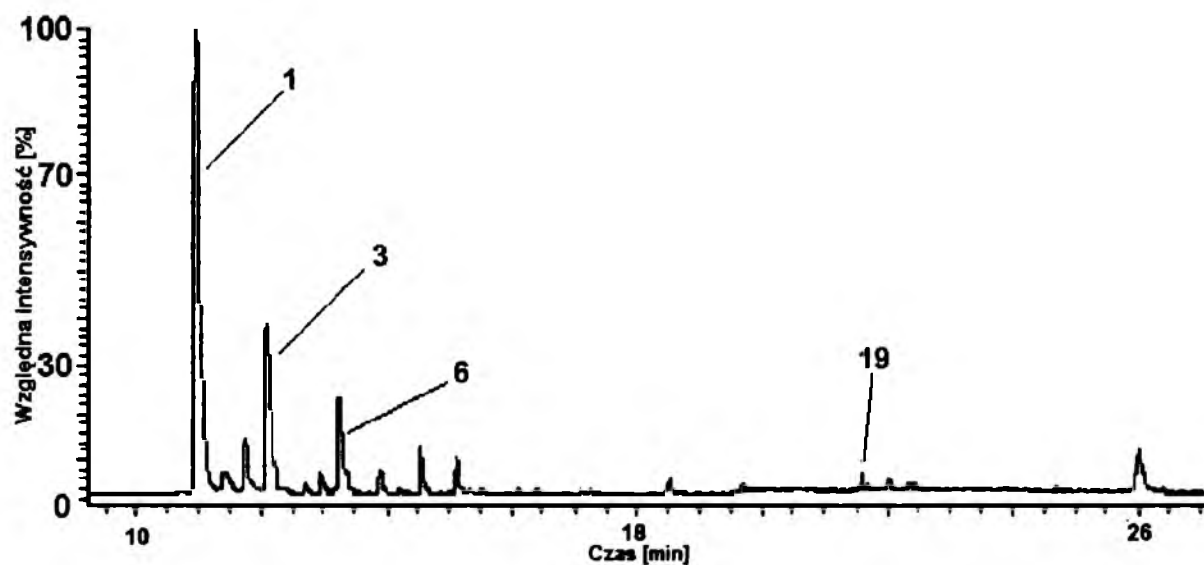


Rys.23. Chromatogram lotnej frakcji *S. cadmica* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.

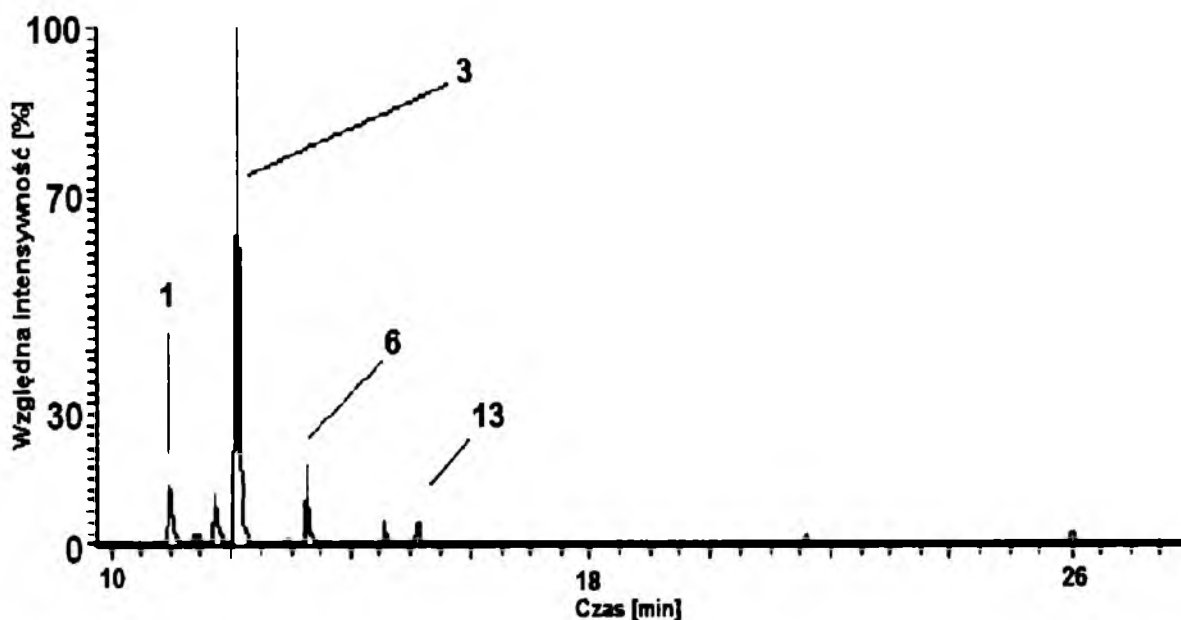




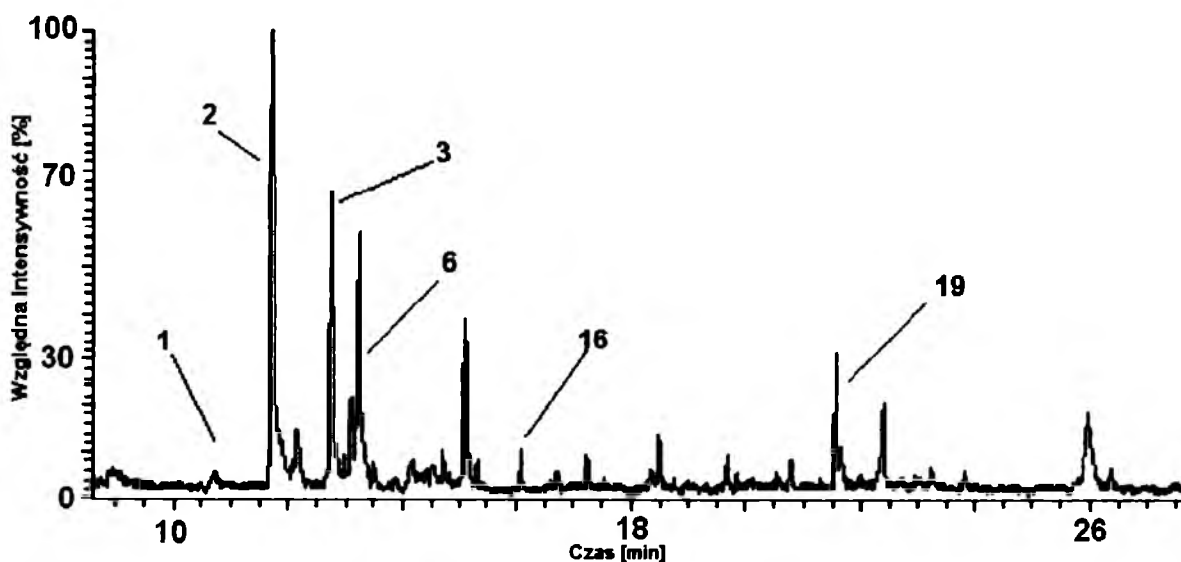
Rys.24. Chromatogram lotnej frakcji *S. canariensis* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



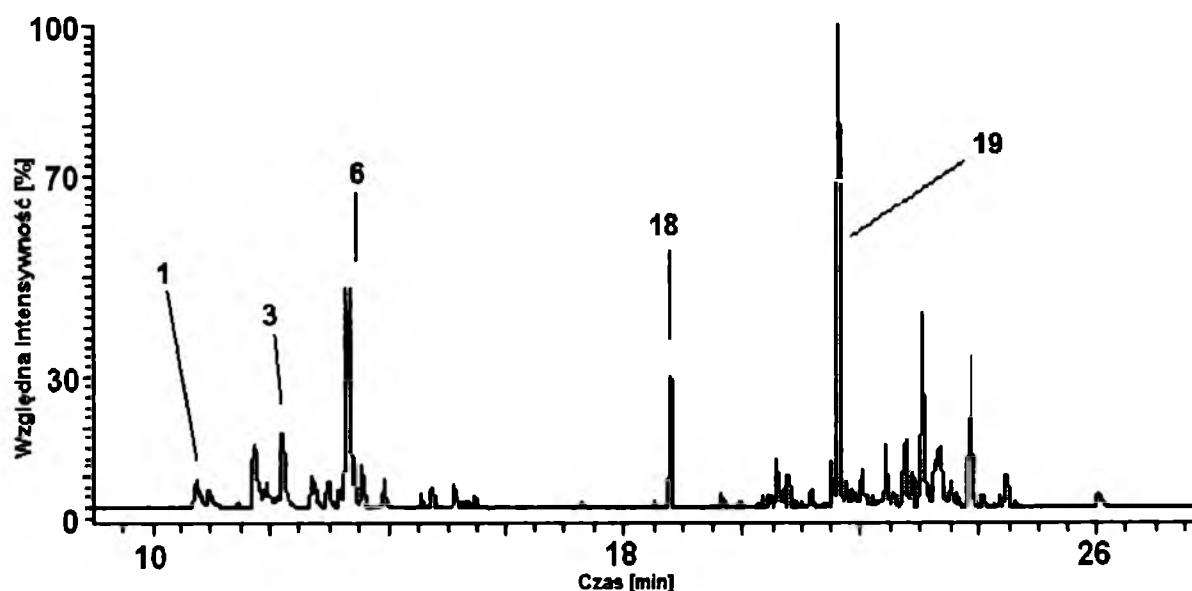
Rys.25. Chromatogram lotnej frakcji *S. deserta* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



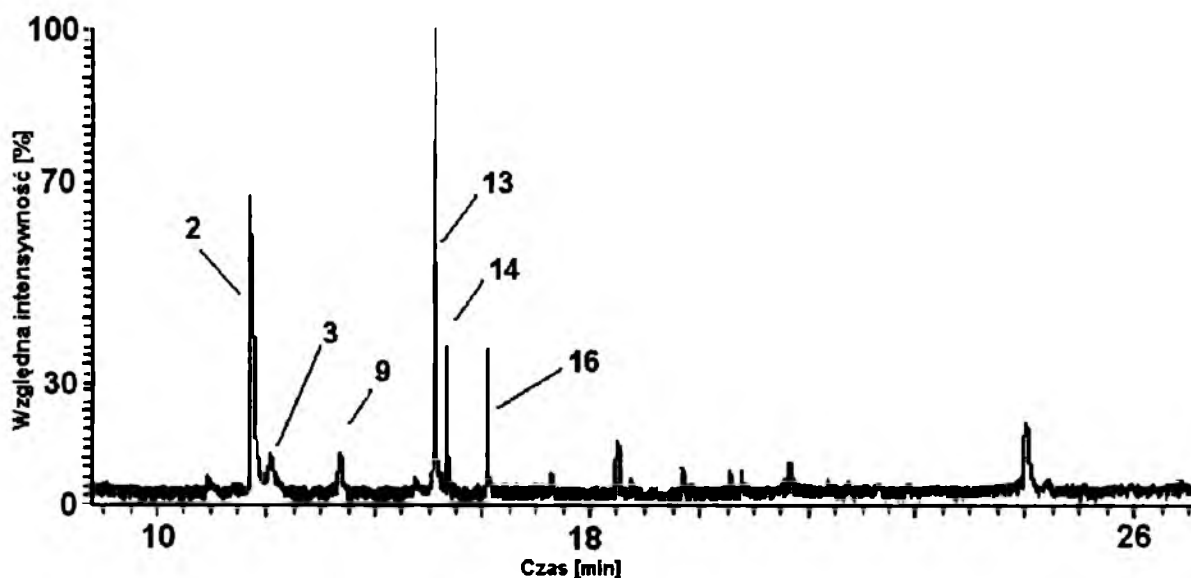
Rys.26. Chromatogram lotnej frakcji *S. farskaohlei* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



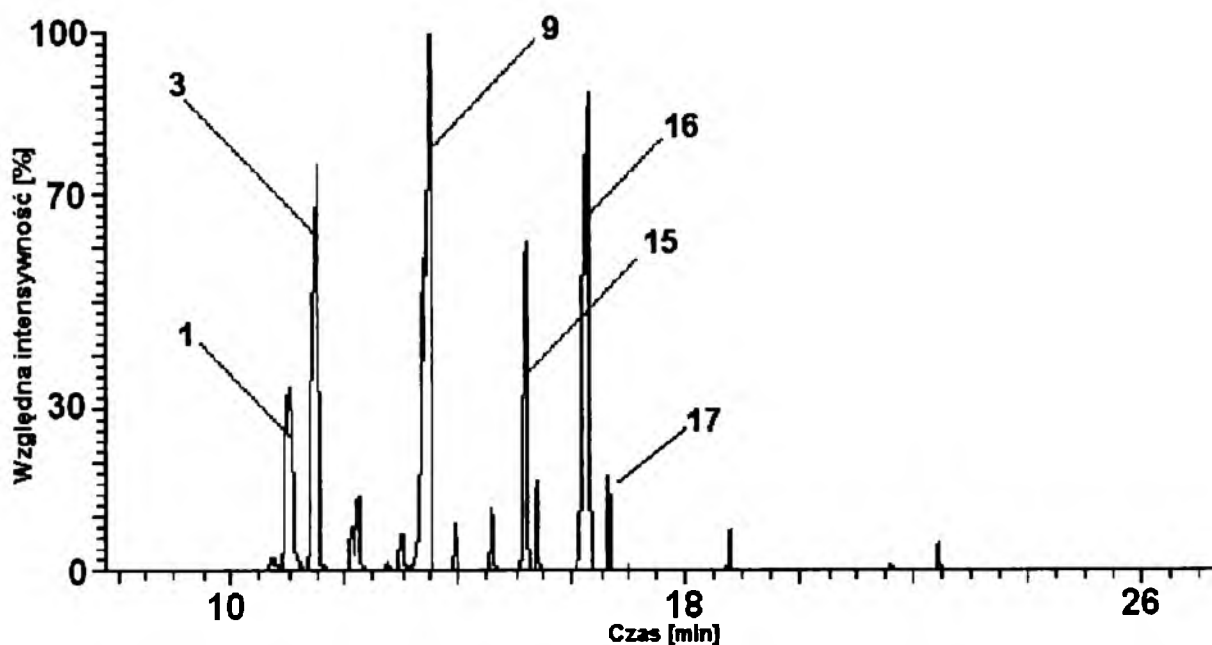
Rys.27. Chromatogram lotnej frakcji *S. glutinosa* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



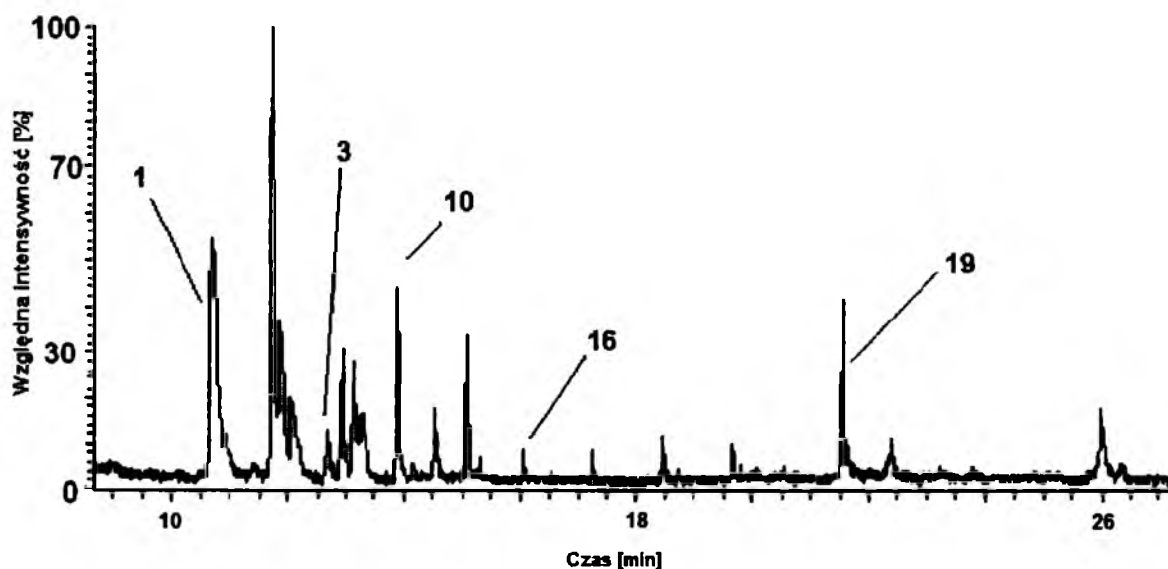
Rys.28. Chromatogram lotnej frakcji *S. hians* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



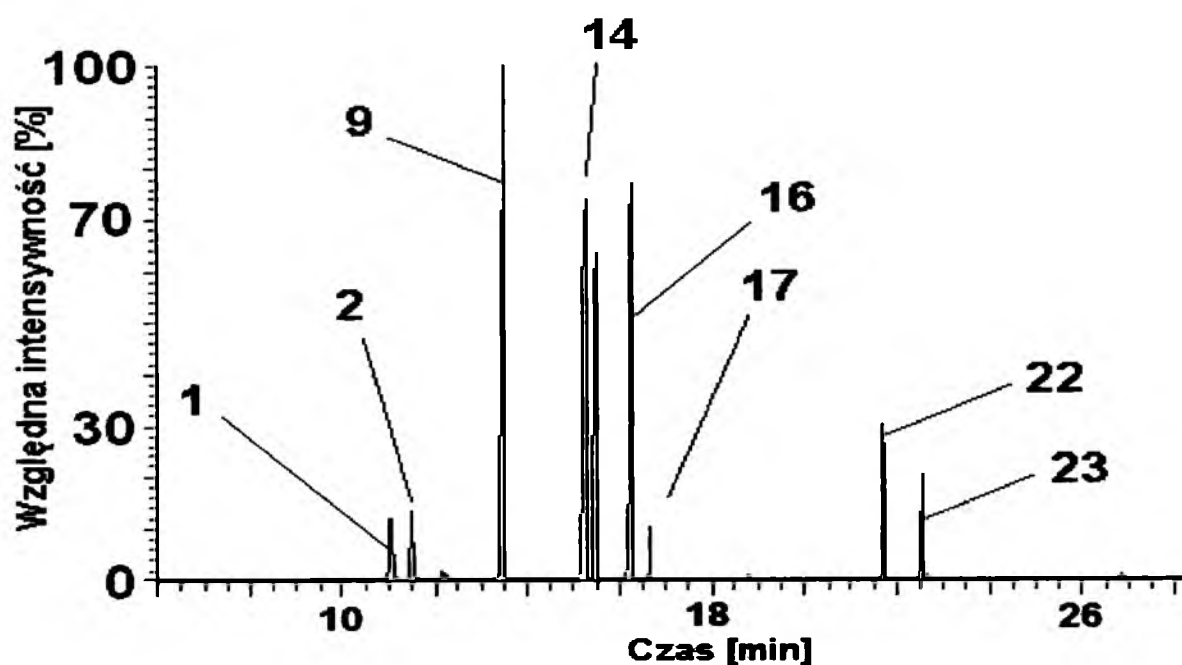
Rys.29. Chromatogram lotnej frakcji *S. jurisicii* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



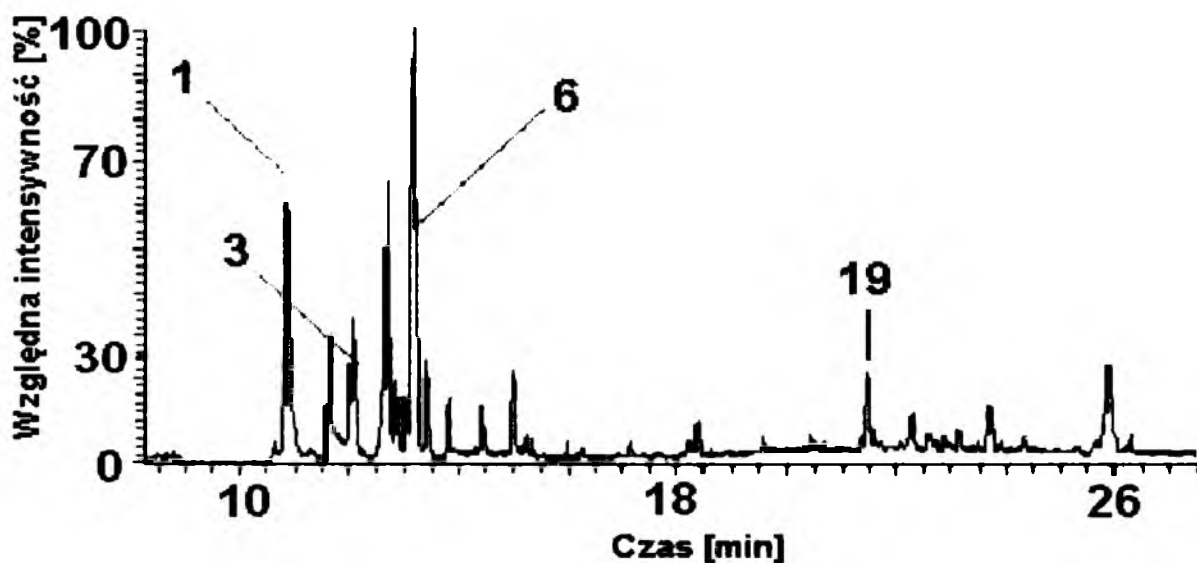
Rys.30. Chromatogram lotnej frakcji *S. lavandulifolia* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



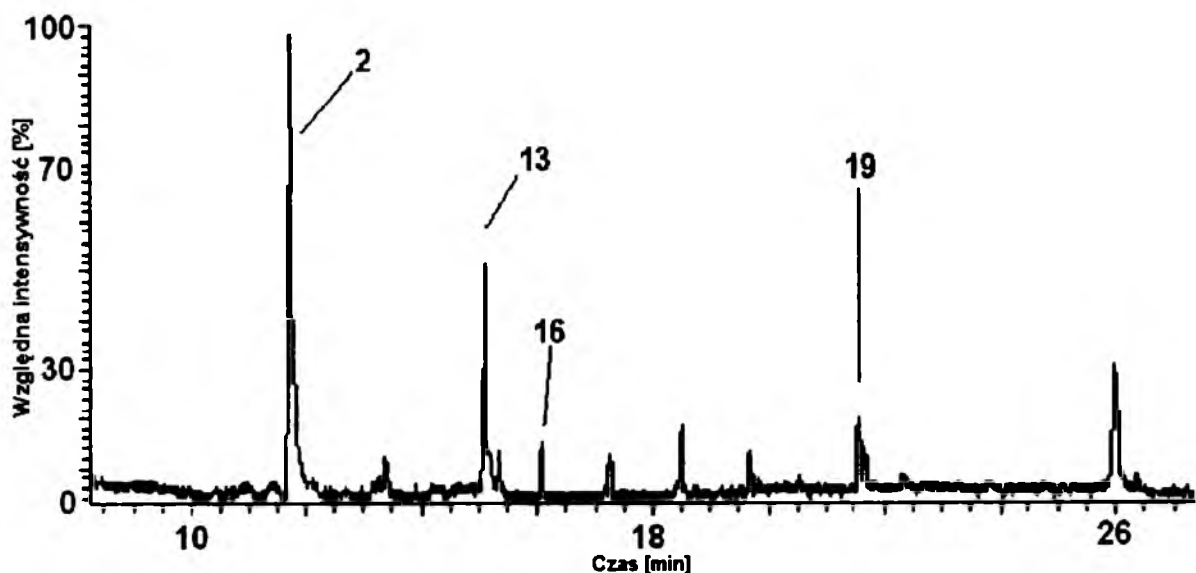
Rys.31. Chromatogram lotnej frakcji *S. nemorosa* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



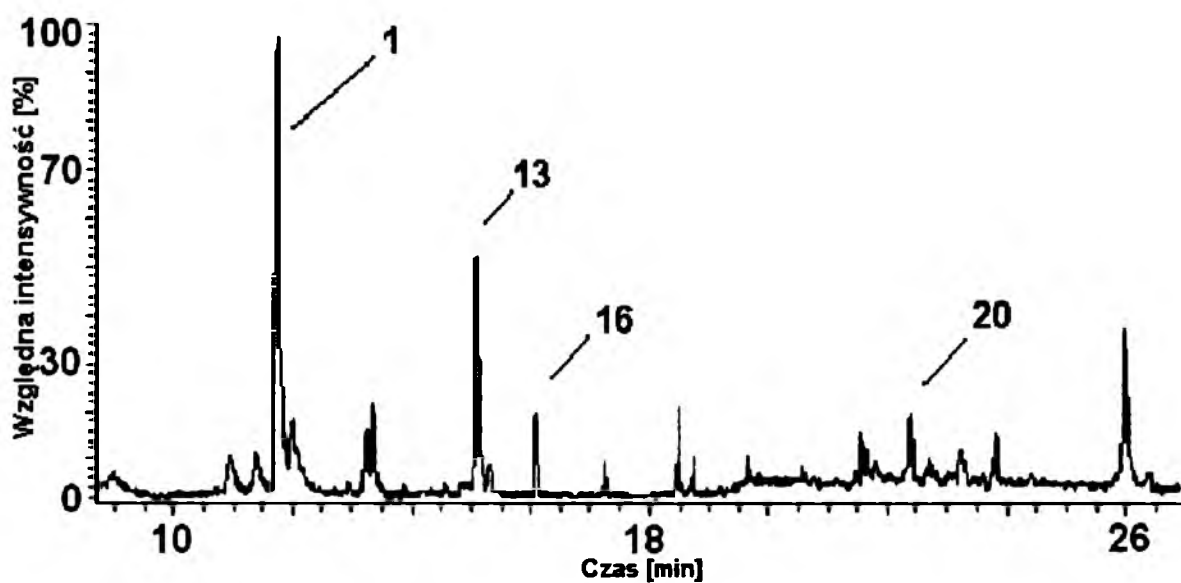
Rys.32. Chromatogram lotnej frakcji *S.officinalis* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



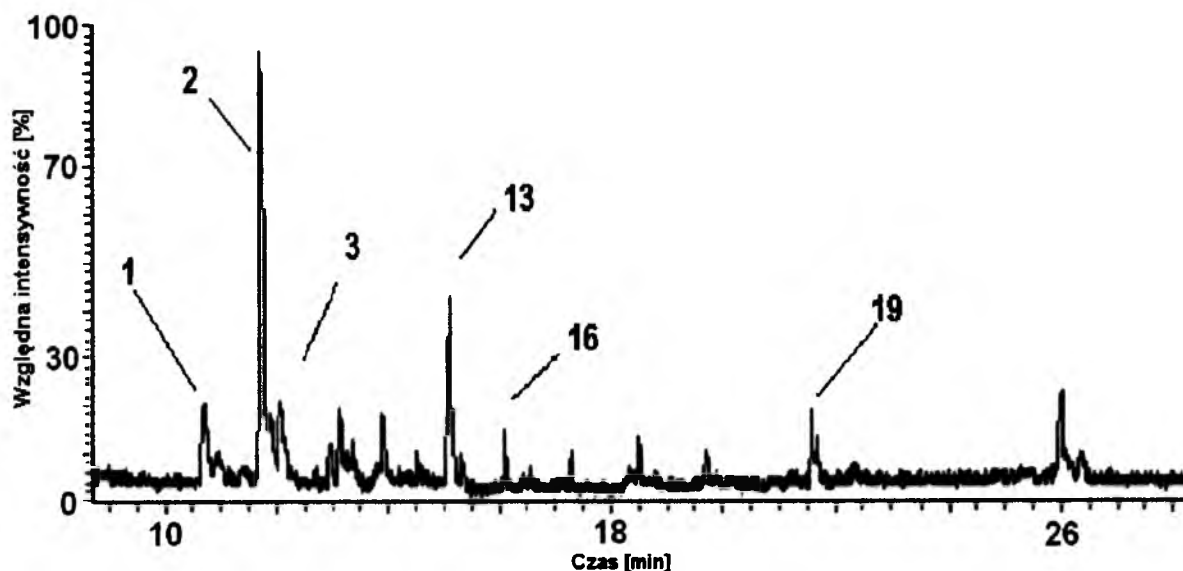
Rys.33. Chromatogram lotnej frakcji *S. staminea* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



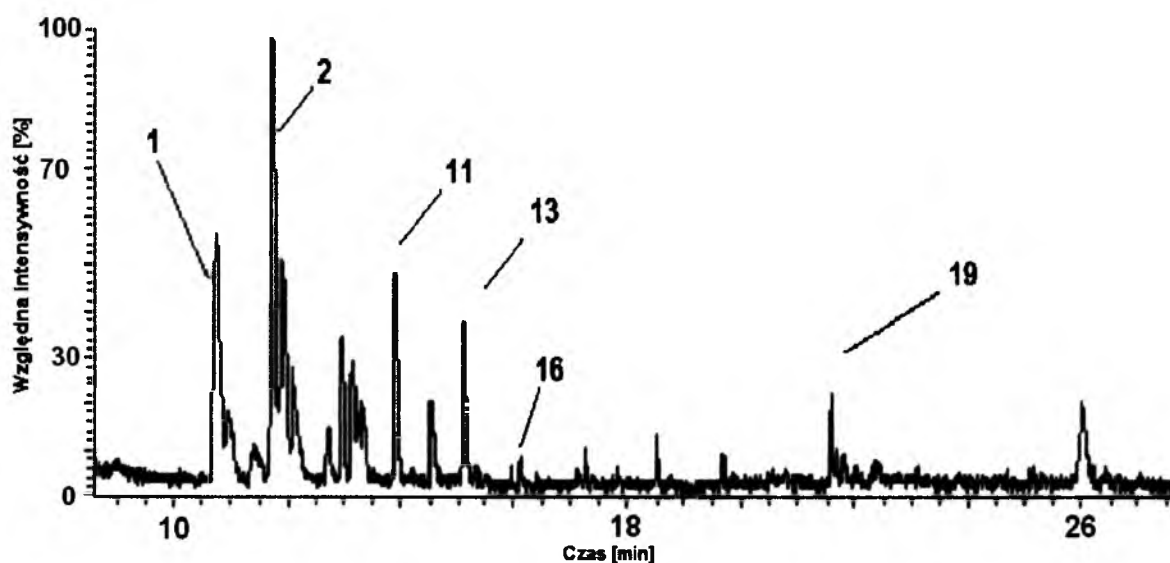
Rys.34. Chromatogram lotnej frakcji *S. sclarea* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



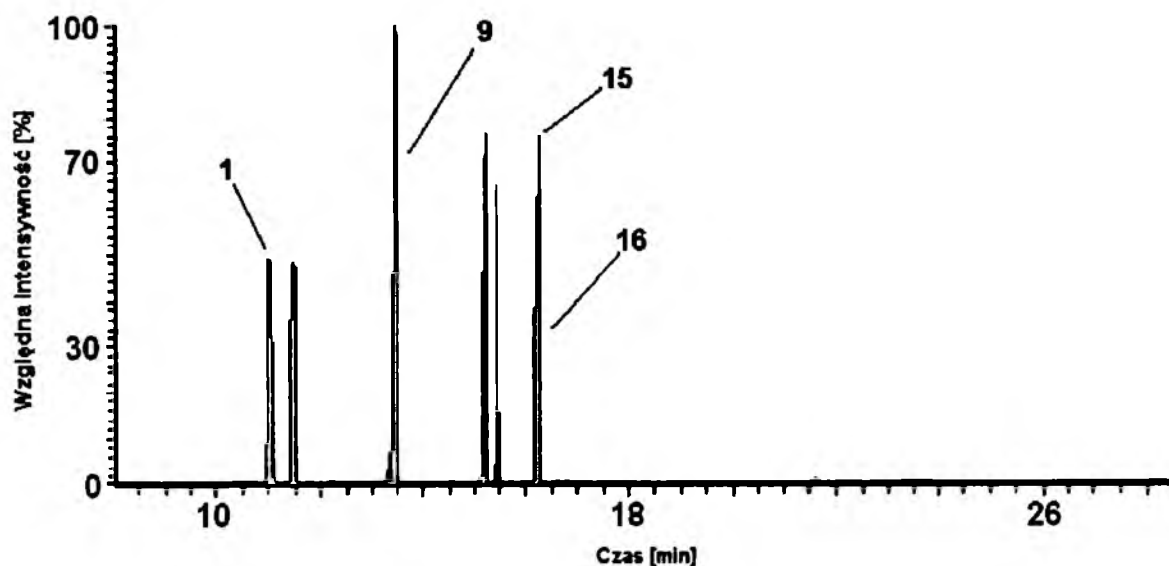
Rys.35. Chromatogram lotnej frakcji *S. pratensis* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



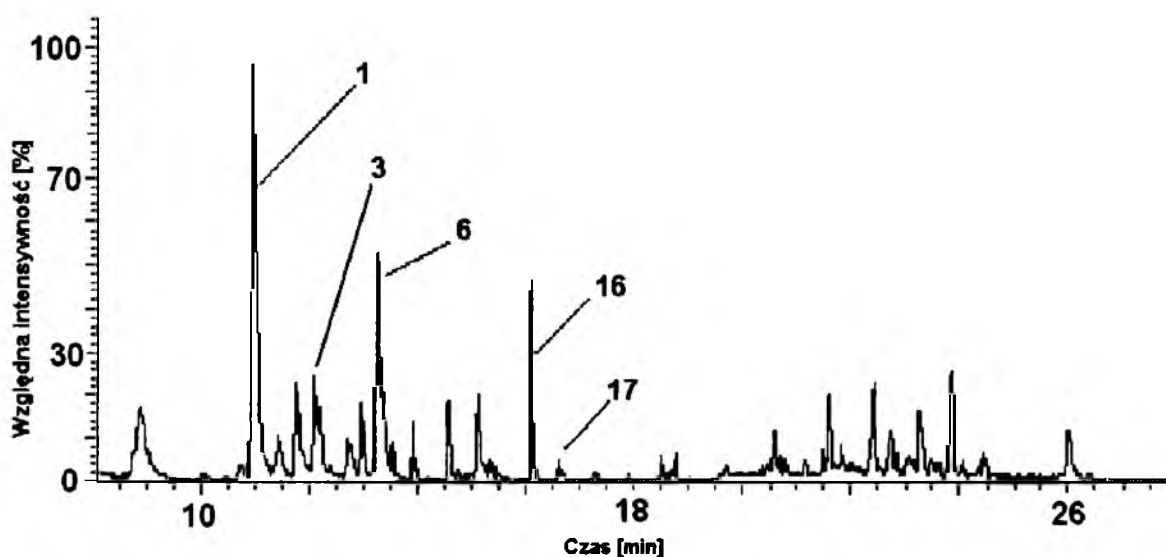
Rys.36. Chromatogram lotnej frakcji *S. stepposa* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramie odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



Rys.37. Chromatogram lotnej frakcji *S. tesquicola* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 µm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramach odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



Rys.38. Chromatogram lotnej frakcji *S. triloba* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramach odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.

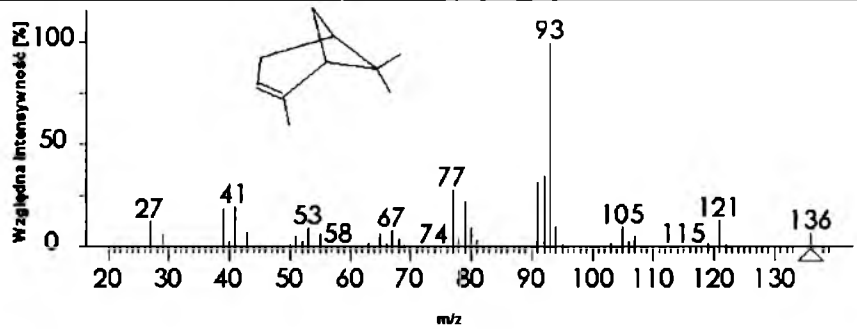
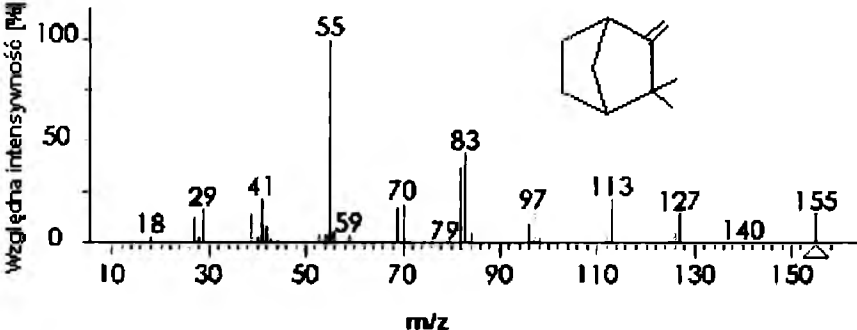
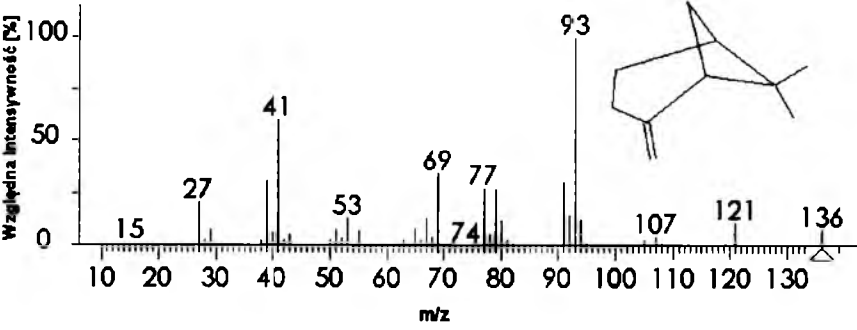


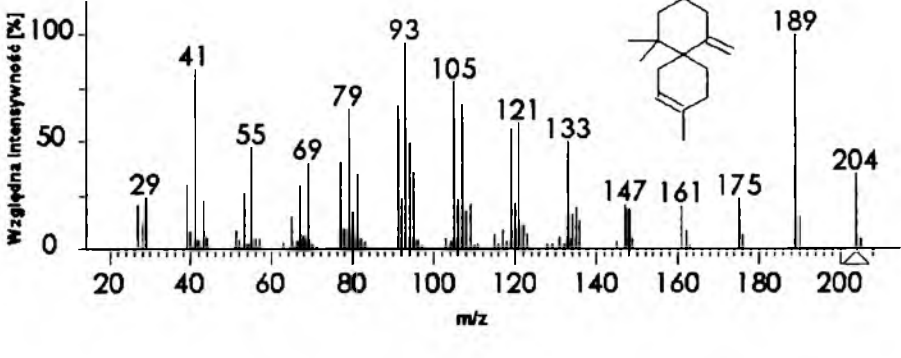
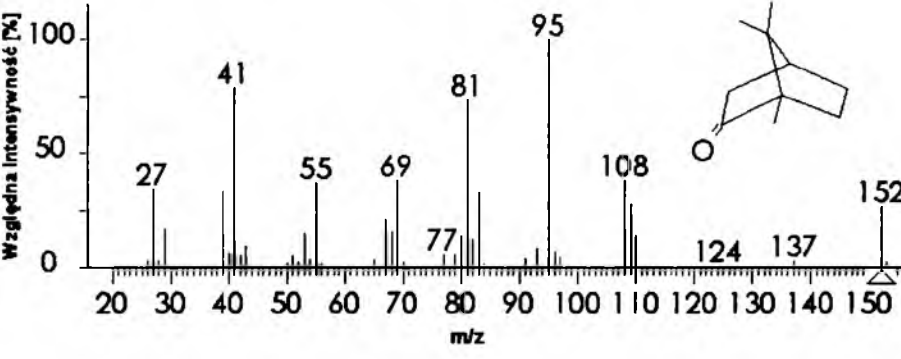
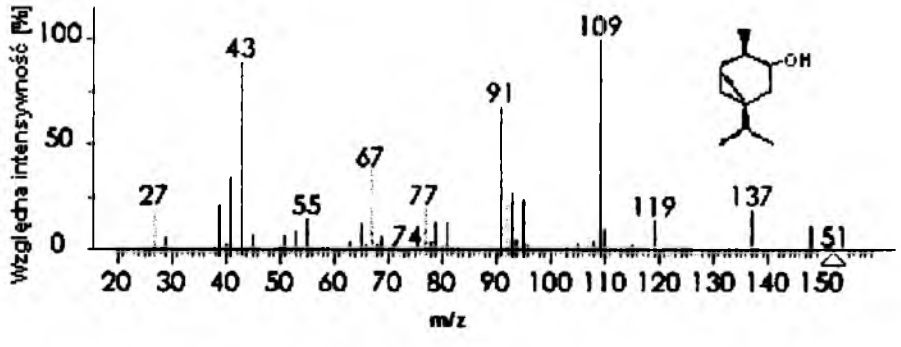
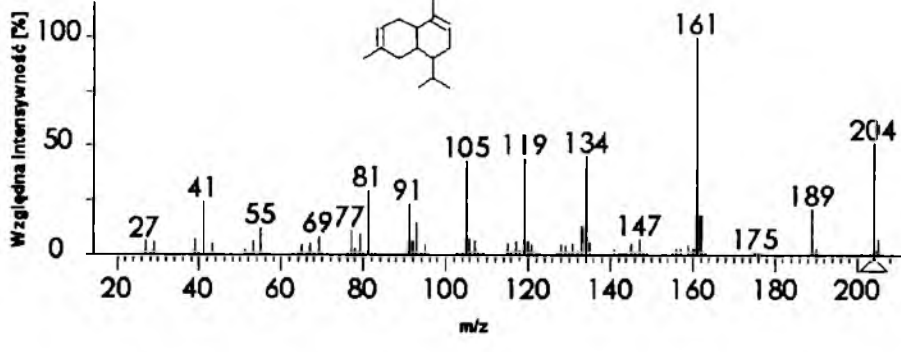
Rys.39. Chromatogram lotnej frakcji *S. verticillata* wykonany techniką HS-GC/MS. Temperatura i czas desorpcji HS: 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa). Numery na chromatogramach odpowiadają związkom lotnym zidentyfikowanym i przedstawionym w tab.10.



W tabeli 11 przedstawiono widma masowe siedmiu wymienionych związków lotnych, najczęściej występujących w badanych gatunkach szalwii, wraz z ich strukturami chemicznymi.

Tab. 11. Widma masowe oraz wzory strukturalne siedmiu związków lotnych, najczęściej występujących w badanych gatunkach szalwii i zidentyfikowanych przy pomocy techniki HS-GC/MS

Substancja lotna	Widmo masowe i wzór strukturalny
$\alpha$ -Pinen	
Kamfen	
$\beta$ -Pinen	

<p><math>\beta</math> Chamigren</p>	 <p>Względna Intensywność [%]</p> <p>m/z</p>
<p>Kamfora</p>	 <p>Względna Intensywność [%]</p> <p>m/z</p>
<p>Tujol</p>	 <p>Względna intensywność [%]</p> <p>m/z</p>
<p>Cadina-3,9- dien</p>	 <p>Względna Intensywność [%]</p> <p>m/z</p>

Istnieje kilka innych związków, które stosunkowo rzadko występują w badanych gatunkach szalwii. Dla przykładu  $\beta$ -mircen wykryto tylko w *S. verticillata*,  $\beta$ -felandren stwierdzono tylko w *S. lavandulifolia*,  $\tau$ -terpinen zidentyfikowano tylko w *S. stepposa*, a izokariofilen i kariofilen zidentyfikowano tylko w *S. officinalis*. Związki te mogą być więc uznane za markery chemotaksonomiczne dla wyżej wymienionych gatunków.

Związki takie, jak o-cymen (obecny w *S. canariensis* i *S. stepposa*),  $\beta$ -trans-ocymen (obecny w *S. lavandulifolia*, *S. sclarea* i *S. amplexicaulis*), tujenon (obecny w *S. staminea*, *S. atropatana*, *S. jurisicii* i *S. officinalis*), jak również tujon (obecny w *S. azurea*, *S. lavandulifolia*, *S. hians* i *S. triloba*) można uznać za wskaźniki chemotaksonomiczne dla poszczególnych gatunków szalwii.

Brak niektórych związków w poszczególnych gatunkach *Salvia* również stanowi istotny wskaźnik chemotaksonomiczny dla tych konkretnych gatunków. I tak w *S. sclarea* brak  $\alpha$ -pinenu i  $\beta$ -pinenu, w *S. lavandulifolia* nie znaleziono kamfenu, *S. triloba* nie zawiera  $\beta$ -pinenu i kamfenu, a *S. officinalis* jest pozbawiona  $\beta$ -chamigrenu, tujolu i cadi-3,9-dienu. Podczas analizy zaobserwowano jeszcze inne składniki lotne, które pozostają niezidentyfikowane, a jednak często pojawiają się w wielu badanych gatunkach szalwii. Dla przykładu, składnik z czasem retencji równym 26,01 min jest obecny aż w czternastu gatunkach, a jego stosunkowo najwyższą zawartość obserwuje się w *S. azurea*, *S. pratensis*, *S. staminea*, *S. cadi-3,9-dien* i *S. sclarea*.

## **5. Analiza olejków eterycznych zawartych w różnych gatunkach szalwii (*Salvia* L.) metodami niskotemperaturowej chromatografii cienkowsarstwowej (LT-TLC) z detekcją densytometryczną i chromatografii gazowej z detekcją masową (GC/MS)**

Olejki eteryczne pochodzenia roślinnego są to wieloskładnikowe mieszaniny między innymi mono-, di-, tri- i seskwiterpenów. Strukturalnie, związki te mogą należeć do grupy węglowodorów, alkoholi, aldehydów, ketonów, estrów, czy eterów. W temperaturze pokojowej wiele z nich to substancje ciekłe o oleistej konsystencji. Skład jakościowy i ilościowy olejków eterycznych jest obecnie w centrum zainteresowania fitochemii i farmakognozji, ze względu na ich uznane właściwości lecznicze, kosmetyczne, ale również i użytkowe. Ich pozytywny wpływ na zdrowie i dobre samopoczucie doceniano już w odległej starożytności. W chwili obecnej olejki eteryczne są szeroko stosowane w aromaterapii (inhalacje, kąpiele aromatyczne i masaże). Jednakże, olejki eteryczne to zazwyczaj skomplikowane mieszaniny i ich skład w większości przypadków nie jest w pełni ustalony. Ze względu na to nie mogą one być traktowane przez lekarzy i farmaceutów jako preparaty ściśle lecznicze, a ich działanie farmakologiczne jest zróżnicowane.

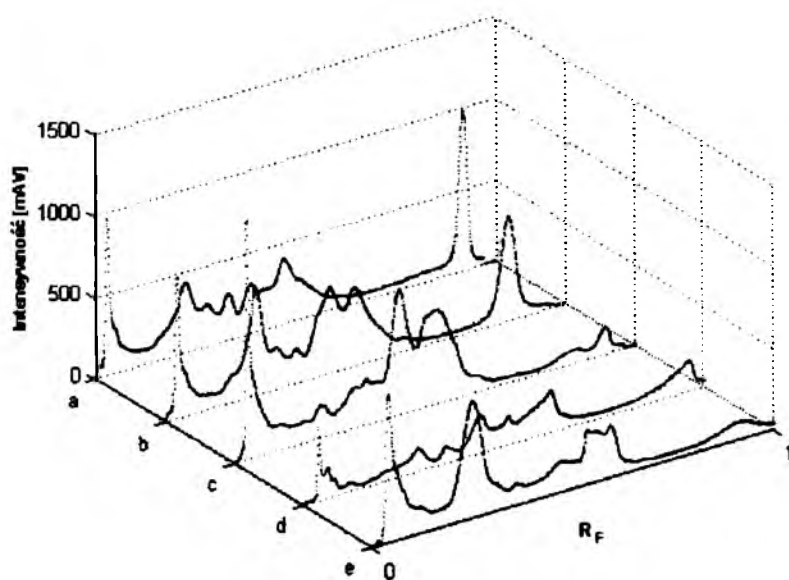
Niektóre z olejków szalwii (np. olejek z *S. sclarea* L.), posiadające w swym składzie chemicznym znaczną część estrów, są powszechnie uważane za nieuczulające i nietoksyczne. Mają one właściwości antyseptyczne, uspokajające, zapachowe, jak również są używane jako afrodyzjaki. Poza tym są wykorzystywane do łagodzenia objawów menopauzy, kryzysu spowodowanego starzeniem się, czy depresji poporodowej ze względu na swe rozluźniające i odprężające właściwości. Olejki eteryczne pochodzące z innych gatunków szalwii, odznaczające się wysoką zawartością ketonów w swym składzie chemicznym (np. olejek *S. officinalis* L.) są uważane za bardziej toksyczne. Mają one właściwości przeciwbólowe, przeciwwirusowe, bakteriobójcze, antyseptyczne, moczopędne, a także zmniejszające przekrwienie błon śluzowych. Są one również źródłem naturalnych przeciwutleniaczy. Olejki eteryczne zawarte w niektórych gatunkach szalwii (np. olejek *S. lavandulifolia* Vahl) składają się głównie z alkoholi, ale również zawierają pewną ilość ciał ketonowych. Ta grupa olejków ma działanie antydepresyjne, przeciwzapalne, przeciwbólowe, pobudzające układ odpornościowy i wpływa korzystnie na gospodarkę hormonalną organizmu. Należy podkreślić, że bezpieczeństwo korzystania z niektórych olejków eterycznych

pochodzących z szalwii jest kwestionowana przez terapeutów z powodu wysokiej zawartości tujonu, który został uznany za związek neurotoksyczny [110-115].

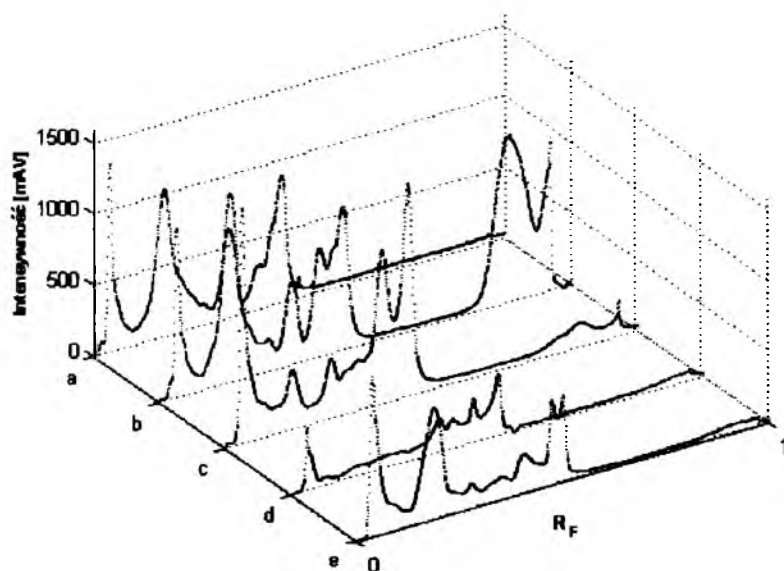
Ze względu na zmienność składu chemicznego olejków eterycznych, związaną z ich lotnością, chromatografia gazowa (GC) stanowi bardzo dobre i do tej pory podstawowe narzędzie do analizy tej grupy związków. Jednak duża uniwersalność techniki chromatografii cienkowarstwowej (TLC), która jest stosunkowo prosta i niedroga, spowodowała wzrost publikacji naukowych na temat analizy składu lotnych substancji zawartych w roślinach tą właśnie techniką. Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) jest używana do wstępnego frakcjonowania olejków eterycznych, a następnie rozdzielone frakcje są analizowane techniką GC/MS.

W omawianych w niniejszym rozdziale badaniach przeanalizowano możliwości zastosowania chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do fingerprintowania olejków eterycznych pochodzących z pięciu różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.), tj. *Salvia lavandulifolia*, *Salvia staminea*, *Salvia hians*, *Salvia triloba* oraz *Salvia nemorosa*. Chromatogramy rozwijano zarówno w pokojowej, jak i obniżonej temperaturze. Wykorzystano także preparatywną chromatografię planarną (PLC) w celu wstępnego frakcjonowania olejków eterycznych przed analizą GC/MS [116].

W pilotażowych badaniach z wykorzystaniem analitycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC) porównano wpływ temperatury na frakcjonowanie olejków eterycznych. W ramach tej analizy porównano dwie różne temperatury, w których prowadzono chromatografowanie (w temperaturze otoczenia 22°C i w temperaturze -10°C, uzyskanej w lodówce). Eksperyment prowadzony w temperaturze -10°C pozwolił otrzymać znacznie lepsze wyniki, zarówno pod względem jakościowym, jak i ilościowym, niż w przypadku zastosowania temperatury 22°C, co można łatwo wywnioskować na podstawie porównania densytogramów przedstawionych na rys. 40a i b.



(a)

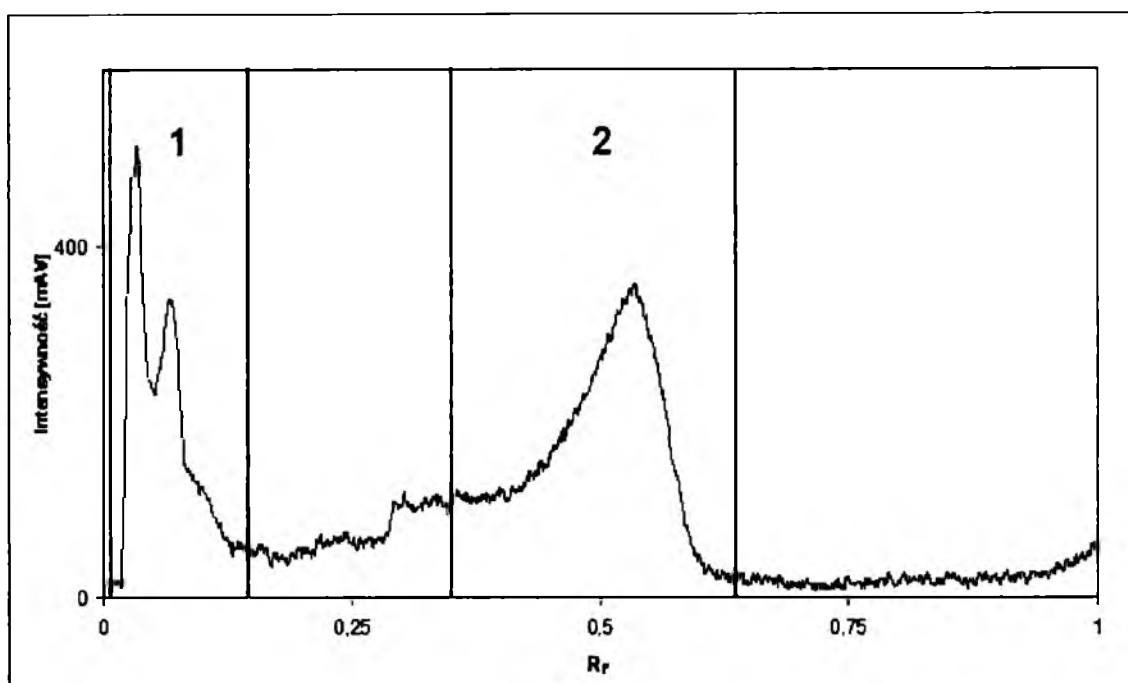


(b)

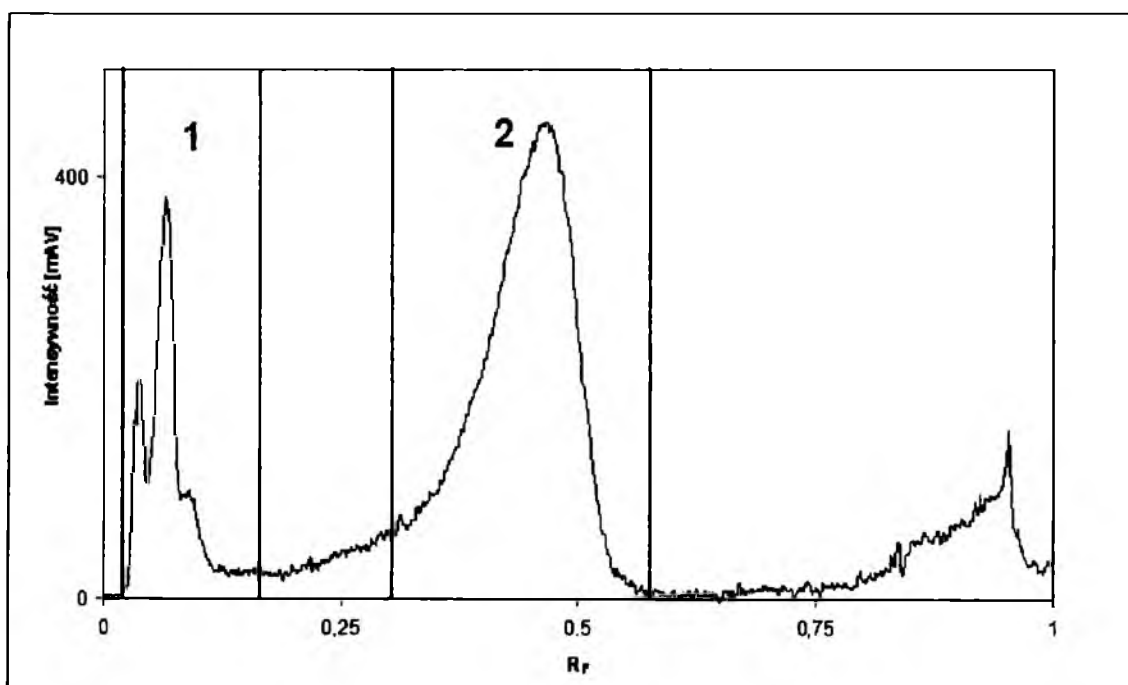
Rys. 40. Porównanie densytogramów analitycznych chromatogramów planarnych przy długości fali 340 nm dla olejków eterycznych pochodzących z pięciu różnych gatunków szalwii (a – *S. hians*, b – *S. staminea*, c – *S. nemorosa*, d – *S. triloba* oraz e – *S. lavandulifolia*), w zależności od zastosowanej temperatury chromatografowania: (a)  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  i (b)  $-10 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (TLC – faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza fuchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesione w ilości 15  $\mu\text{L}$ ; droga rozwijania – 15cm)

Dla potrzeb chromatografii cienkowarstwowej (TLC) użyto fazy ruchomej zaczerpniętej z publikacji [117], w której pierwotnie wykorzystano ją do analizy olejków eterycznych zawartych w roślinach *Carum carvi* L., *Mentha piperita* L., *Juniperus communis* L. i *Chamomilla recutita* L. W ten sposób pokazano, że ten sam eluent doskonale nadaje się do rozdzielania olejków eterycznych pochodzących z różnych gatunków szalwii. Na podstawie densytogramów można wnioskować, że chromatografia cienkowarstwowa jest bardzo przydatna w fingerprintowaniu olejków eterycznych zawartych w poszczególnych gatunkach szalwii oraz, że zastosowanie obniżonej temperatury daje znacznie lepsze rezultaty, co jest zrozumiałe ze względu na lotność badanych związków.

Kolejnym krokiem był rozdział olejków eterycznych z wykorzystaniem preparatywnej chromatografii planarnej (PLC). Na rys. 41 a i b pokazano densytogramy preparatywnych chromatogramów planarnych dla *Salvia lavandulifolia* L. i *Salvia triloba*.



(a)



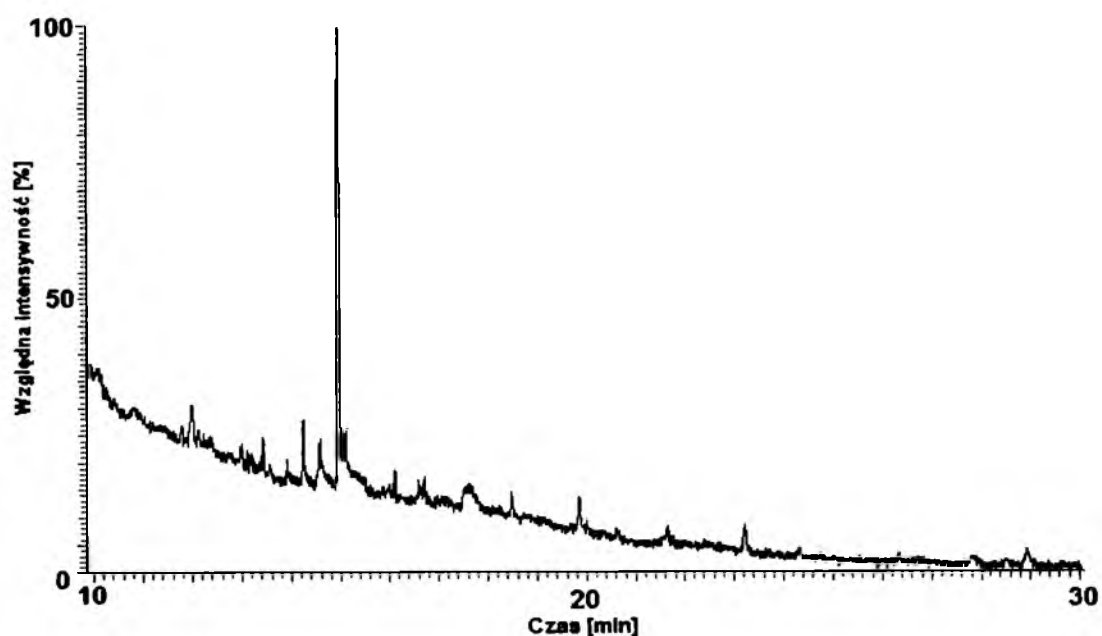
(b)

Rys. 41. Densytogramy preparatywnych chromatogramów planarnych dla olejków eterycznych pochodzących z (a) *S. lavandulifolia* i (b) *S. triloba* (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza fuchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 40  $\mu\text{L}$ ; temperatura  $-10^\circ\text{C}$ ; droga rozwijania - 15cm)

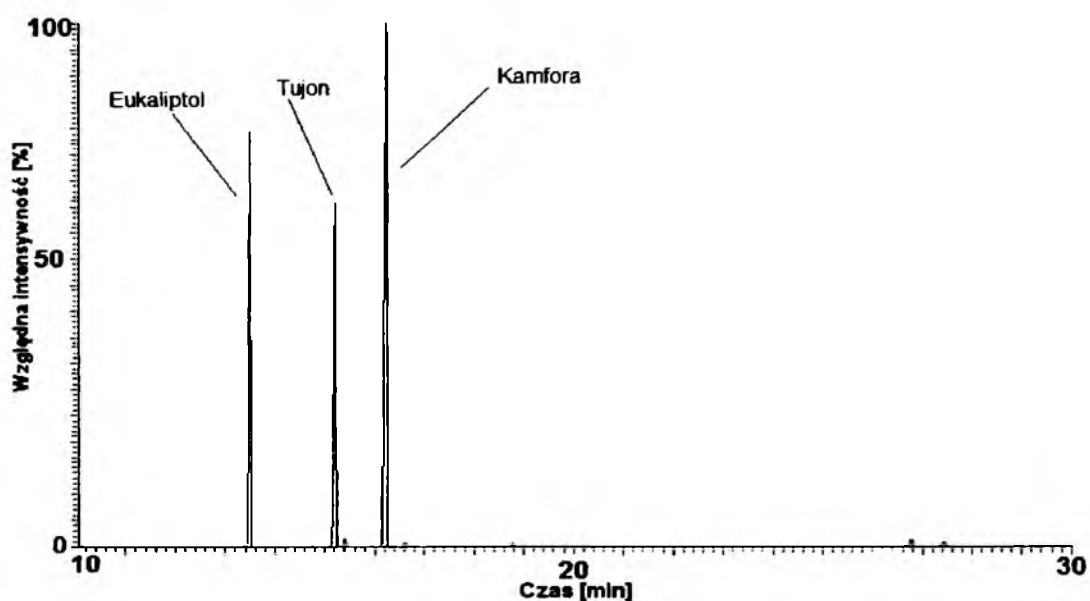


Sprawność rozdzielcza przy zastosowaniu chromatografii preparatywnej (PLC) była gorsza, niż w przypadku analitycznej chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Profile stężeniowe otrzymane z PLC były mniej zróżnicowane, niż te pochodzące z TLC. Mogło to być spowodowane naniesieniem niedostatecznej ilości próbki na grubszą warstwę adsorbenta w porównaniu z chromatogramami analitycznymi. W związku z tym chromatogramy preparatywne zostały podzielone tylko na dwie frakcje, co przedstawiono na rys. 41 a i b.

Każda frakcja łącznie z warstwą żelu krzemionkowego była starannie zeskrobywana z płytki szklanej, następnie dodawano do nich porcję metanolu i umieszczano w łaźni ultradźwiękowej na 30 minut. Po tym czasie roztwór przepuszczano przez filtr strzykawkowy z tlenkiem glinu jako adsorbentem w celu oddzielenia żelu krzemionkowego od roztworu. Tak przygotowane próbki w dalszej części były analizowane przy pomocy chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją masową (GC/MS). Na rys. 42 a i b zaprezentowano chromatogramy gazowe frakcji 1 i 2 olejku pochodzącego z *S. lavandulifolia*, rozdzielonego wstępnie przy użyciu preparatywnej chromatografii planarnej, a na rys. 43 a i b przedstawiono analogiczne chromatogramy gazowe frakcji 1 i 2 olejku pochodzącego z *S. triloba*.

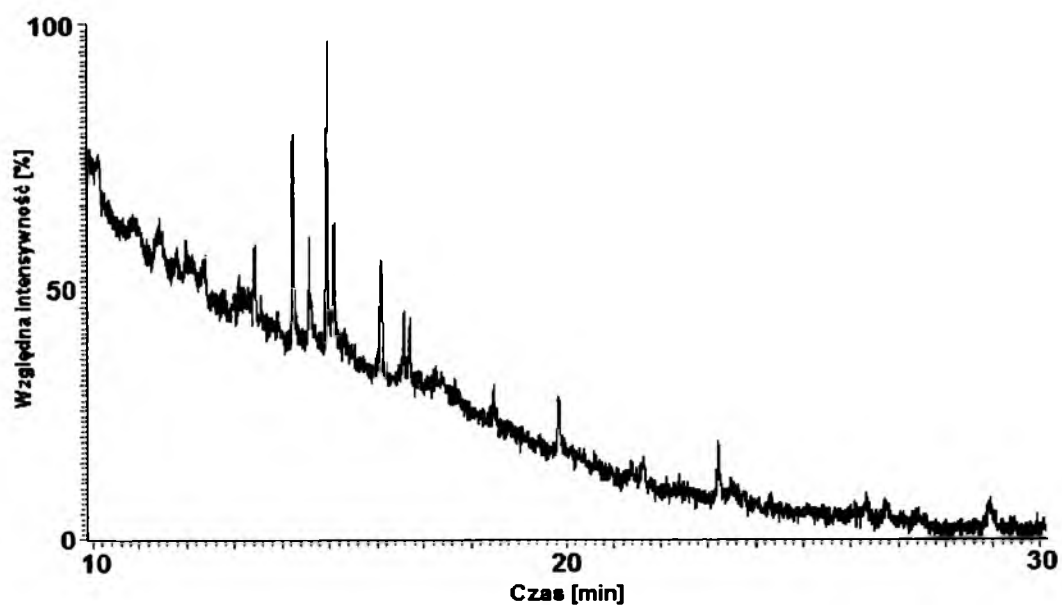


(a)

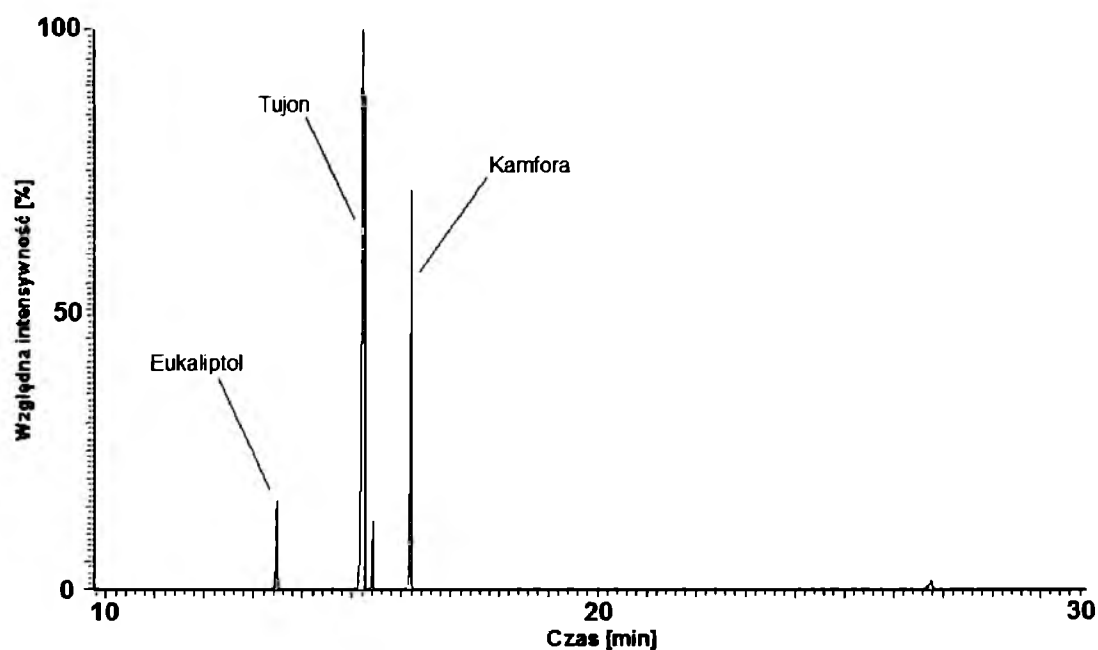


(b)

Rys. 42. Chromatogramy gazowe otrzymane dla (a) frakcji 1 i (b) frakcji 2 olejku eterycznego pochodzącego z *Salvia lavandulifolia* wstępnie rozdzielonego przy pomocy preparatywnej chromatografii planarnej (PLC) (rys. 41a). We frakcji 2 zidentyfikowano eukaliptol, tujon oraz kamforę (identyfikacja została przeprowadzona z wykorzystaniem widm biblioteki NIST i widm olejków eterycznych sosny, mięty, eukaliptusa i jałowca)



(a)



(b)

Rys. 43. Chromatogramy gazowe otrzymane dla (a) frakcji 1 i (b) frakcji 2 olejku eterycznego pochodzącego z *Salvia triloba* wstępnie rozdzielonego przy pomocy preparatywnej chromatografii planarnej (PLC) (rys. 41b). We frakcji 2 zidentyfikowano eukaliptol, tujon oraz kamforę (identyfikacja została przeprowadzona z wykorzystaniem widm biblioteki NIST i widm olejków eterycznych sosny, mięty, eukaliptusa i jałowca)

Z przedstawionych na rys. 42 i 43 chromatogramów gazowych wynika, że w obu przypadkach we frakcji 2 zidentyfikowano eukaliptol, tujon i kamforę. We frakcji 1 nie zidentyfikowano żadnego z dostępnych w bibliotece NIST terpenów. Wyniki analizy GC/MS można uznać za zadowalające, zwłaszcza w porównaniu z wcześniejszymi badaniami przedstawionymi w publikacji [107]. Na podstawie wyników podanych w tabeli 7 [107] można stwierdzić, że eukaliptol, tujon i kamfora stanowią znaczną część całkowitej zawartości terpenów w *S. lavandulifolia*. Na podstawie tego samego źródła (Tab. 7. [107]) wiadomo, że eukaliptol, tujon i kamfora stanowią trzy z czterech terpenów zidentyfikowanych w *Salvia triloba*. Na brak identyfikacji kilku innych terpenów obecnych w *Salvia lavandulifolia* i jednego ( $\alpha$ -pinen) obecnego w *Salvia triloba* mogło mieć wpływ to, że ilości próbek olejków eterycznych stosowanych do chromatografii preparatywnej (PLC) były zbyt niskie i powinny być wcześniej starannie zoptymalizowane w odrębnym eksperymencie, w zależności od badanego gatunku szalwii. Główną przeszkodą we frakcjonowaniu terpenów przy pomocy chromatografii preparatywnej (PLC) jest konieczność stosowania znacznej ilości rozpuszczalników do wymywania składników z warstwy żelu krzemionkowego. To pociąga za sobą kolejny problem związany z dalszym usuwaniem tych rozpuszczalników celem zatężenia analizowanych substancji. Na podstawie powyższych rozważań można sformułować następujące wnioski:

- Chromatografia cienkowarstwowa (TLC) nie jest podstawową techniką służącą do analizy lotnych związków organicznych, a pierwszeństwo w badaniach tej grupy związków ma niewątpliwie chromatografia gazowa sprzężona z detekcją masową (GC/MS). Dlatego też analiza olejków eterycznych przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC) stanowi stosunkowo trudne zadanie analityczne.
- Temperatura ma znaczny wpływ na rozdział olejków eterycznych metodą TLC. Obniżenie temperatury bardzo poprawia jakość uzyskiwanego rozdziału.
- Niskotemperaturowa analityczna chromatografia cienkowarstwowa (LT-TLC) z detekcją densytometryczną może być z powodzeniem wykorzystywana do tworzenia fingerprintów olejków eterycznych zawartych w poszczególnych gatunkach szalwii.
- Niskotemperaturowa preparatywna chromatografia cienkowarstwowa (LT-PLC) może być używana do wstępnego frakcjonowania olejków eterycznych w celu

ułatwienia dalszej analizy przy pomocy techniki GC/MS. Zawartości olejków eterycznych poszczególnych gatunków szalwii różnią się jednak w znacznym stopniu między sobą, co powoduje konieczność indywidualnej optymalizacji ilości olejku użytego w chromatografii preparatywnej.

## 6. Analiza olejków eterycznych szalwii przy użyciu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrią masową (LT-TLC-MS)

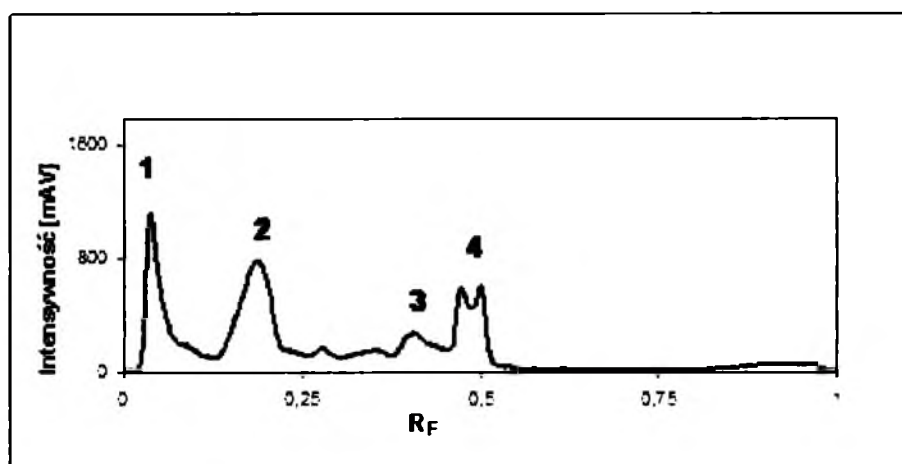
Chromatografia planarna zarówno w trybie analitycznym, jak i preparatywnym jest prostym i cenionym narzędziem rozdzielania związków chemicznych. W niektórych przypadkach możliwości tej metody przewyższają inne, bardziej skomplikowane, techniki instrumentalne. Chromatografię planarną charakteryzuje duża elastyczność, prosty i stosunkowo tani sprzęt do analizy, możliwość wykonywania kilku równoległych analiz przy pomocy jednej płytki chromatograficznej, jak również możliwość rozdzielenia w niektórych przypadkach, tak trudnych do analizy związków, jak pary enancjomerów [118].

W publikacjach [117, 119] zostały przedstawione wyniki badań lotnych substancji pochodzenia botanicznego (głównie olejków eterycznych) z wykorzystaniem niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC). Wykazano, że żel krzemionkowy charakteryzuje się znaczną siłą adsorpcyjną i skutecznie unieruchamia składniki olejków na powierzchni fazy stacjonarnej, co daje możliwość dalszej analizy „off-line” w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem różnych technik instrumentalnych.

W artykule [116], opisanym w poprzednim rozdziale niniejszej pracy, wprowadzono niskotemperaturowy wariant preparatywnej chromatografii planarnej (PLC) do rozdzielenia olejków eterycznych zawartych w pięciu gatunkach szalwii (*Salvia* L. sp.). Po wstępnej separacji na płycie chromatograficznej, ekstrahowano poszczególne frakcje z żelu krzemionkowego i ostatecznie analizowano je przy użyciu chromatografii gazowej z detekcją masową (GC/MS). Niedawno pojawiła się możliwość wykorzystania techniki spektrometrii masowej przy identyfikacji związków wstępnie rozdzielonych przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej (TLC) [55-62]. Takie połączenie pozwala wymywać rozdzielone pasma z płytki chromatograficznej i kierować je bezpośrednio do spektrometru masowego (z wykorzystaniem przystawki TLC-MS). Przy próbkach zawierających niewiele składników istnieje możliwość pełnego rozdzielenia ich na pojedyncze związki, a tym samym rejestracji widm masowych dla pojedynczych związków. Przy złożonym składzie analitu, chromatografia cienkowarstwowa (TLC) pozwala jedynie na frakcjonowanie go na mniej złożone mieszaniny, a zastosowana spektrometria masowa (MS) pozwala

przedstawić je w postaci fingerprintów charakterystycznych dla danej frakcji. Mogą one następnie zostać poddane analizie chemometrycznej i statystycznej w celu pokazania istotnych różnic między poszczególnymi gatunkami roślin.

Eksperyment przedstawiony w niniejszym rozdziale miał na celu otrzymanie fingerprintów olejków eterycznych z użyciem techniki niskotemperaturowej analitycznej chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrią mas (LT-TLC-MS) dla pięciu różnych gatunków szalwii (*Salvia lavandulifolia*, *Salvia staminea*, *Salvia hians*, *Salvia triloba* oraz *Salvia nemorosa*). Zastosowanie przystawki TLC-MS pozwoliło uniknąć pracochłonnych czynności związanych z zeszkrobaniem rozdzielonych pasm z płytki chromatograficznej, klasyczną ekstrakcją i dalszą analizą techniką GC/MS. Pierwszym krokiem był rozdział olejków eterycznych szalwii przy pomocy niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC) oraz zarejestrowanie densytogramów i wideoskanów poszczególnych próbek. Następnie rozdzielone pasma poddano analizie z użyciem spektrometrii masowej (MS). Na rys. 44, 46, 48, 50 i 52 przedstawiono chromatogramy dla poszczególnych analizowanych gatunków szalwii, składające się z densytogramów i wideoskanów, natomiast na rys. 45, 47, 49, 51 i 53 zamieszczono widma masowe dla każdej chromatograficznie rozdzielonej frakcji.



(a)

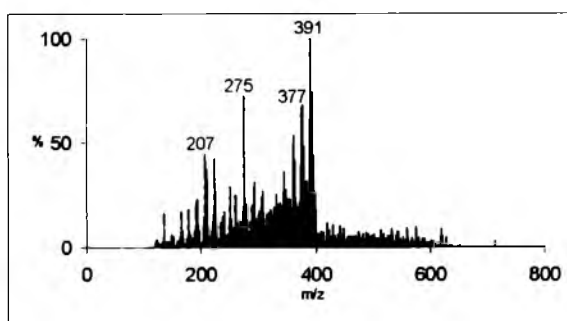


(b)

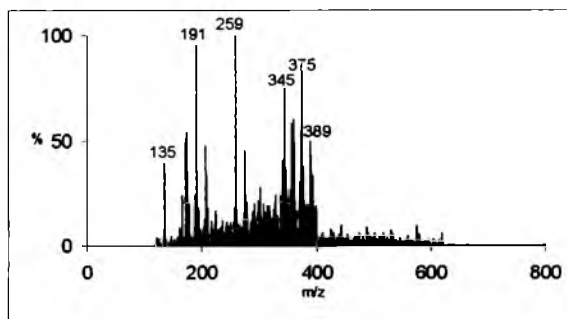
Rys. 44. Densytogram (a) oraz wideoscan (b) dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia* (faza stacjonarna: SiO<sub>2</sub>, faza ruchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 15  $\mu$ L; temperatura -10°C; droga rozwijania 15cm)



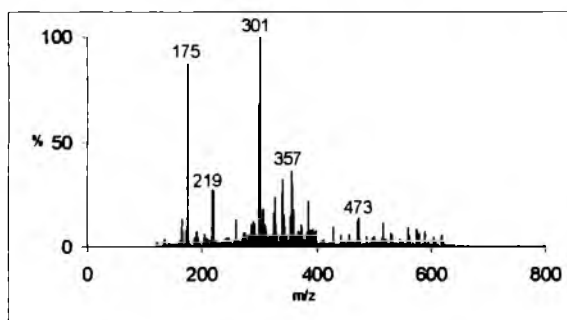
(1)



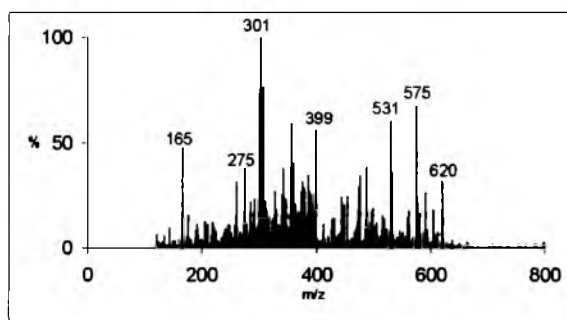
(2)



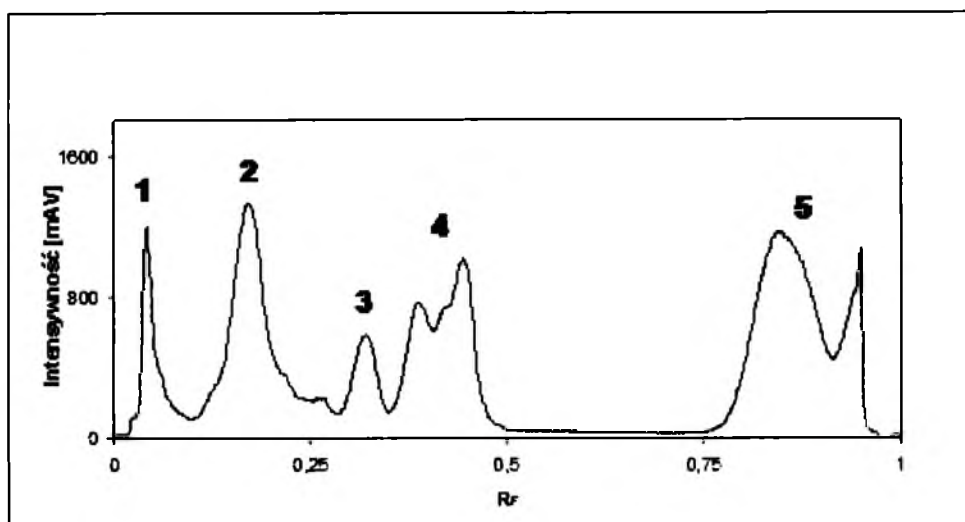
(3)



(4)



Rys. 45. Widma masowe (1-4) zarejestrowane dla czterech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia*, wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70 V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

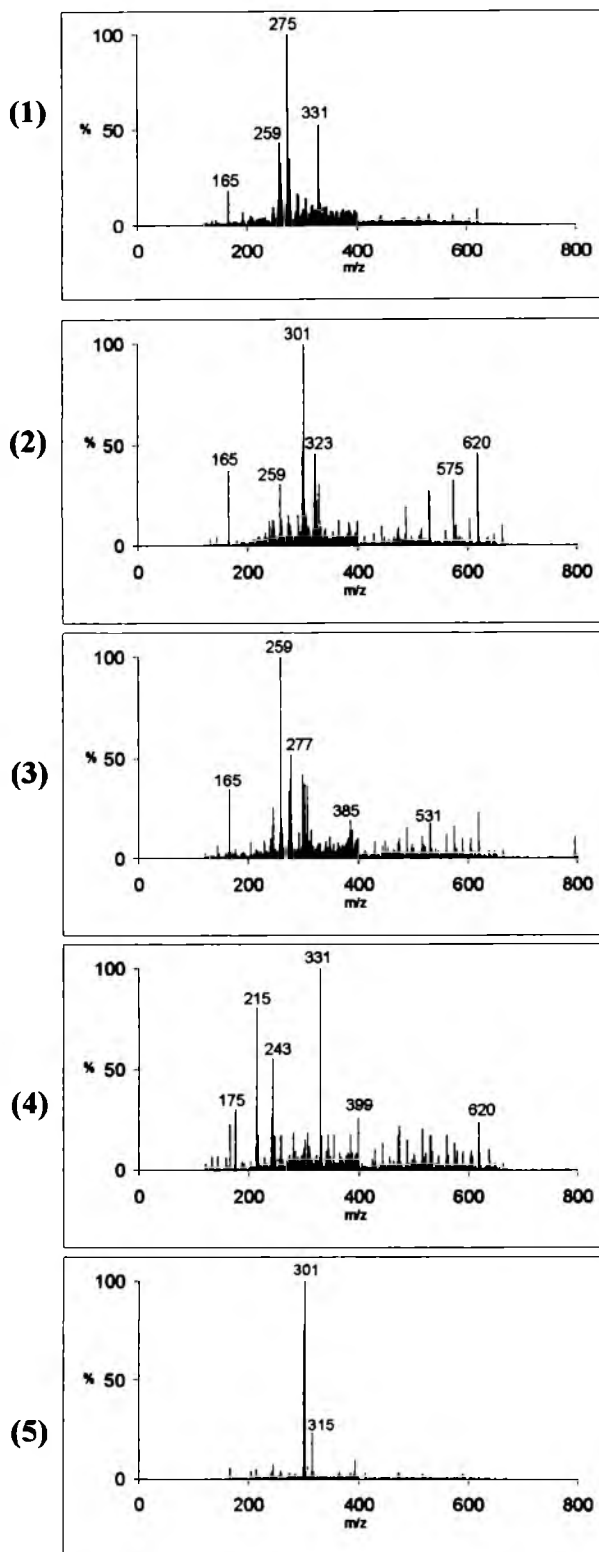


(a)

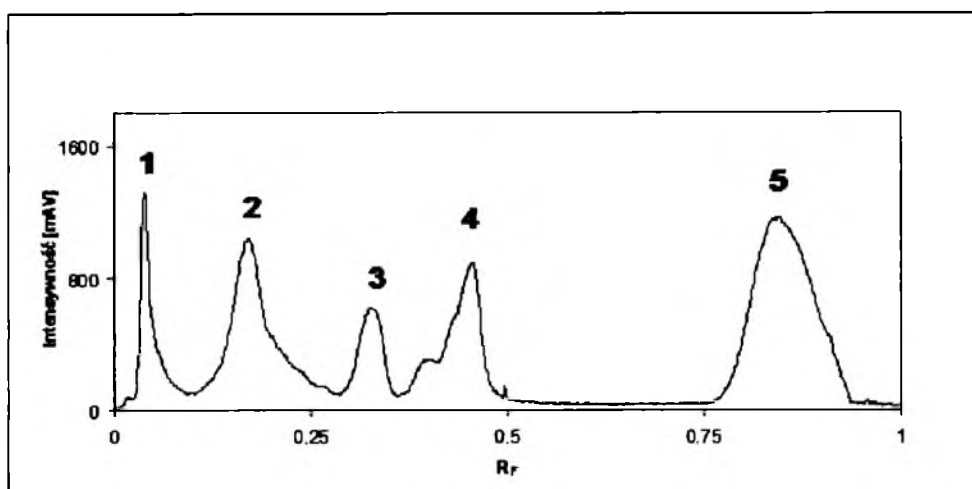


(b)

Rys. 46. Densytogram (a) oraz wideoscan (b) dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia staminea* (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza ruchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 15  $\mu\text{L}$ ; temperatura  $-10^\circ\text{C}$ ; droga rozwijania 15cm)



Rys. 47. Widma masowe (1-5) zarejestrowane dla pięciu rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z olejku eterycznego *Salvia staminea*, wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatkowo 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

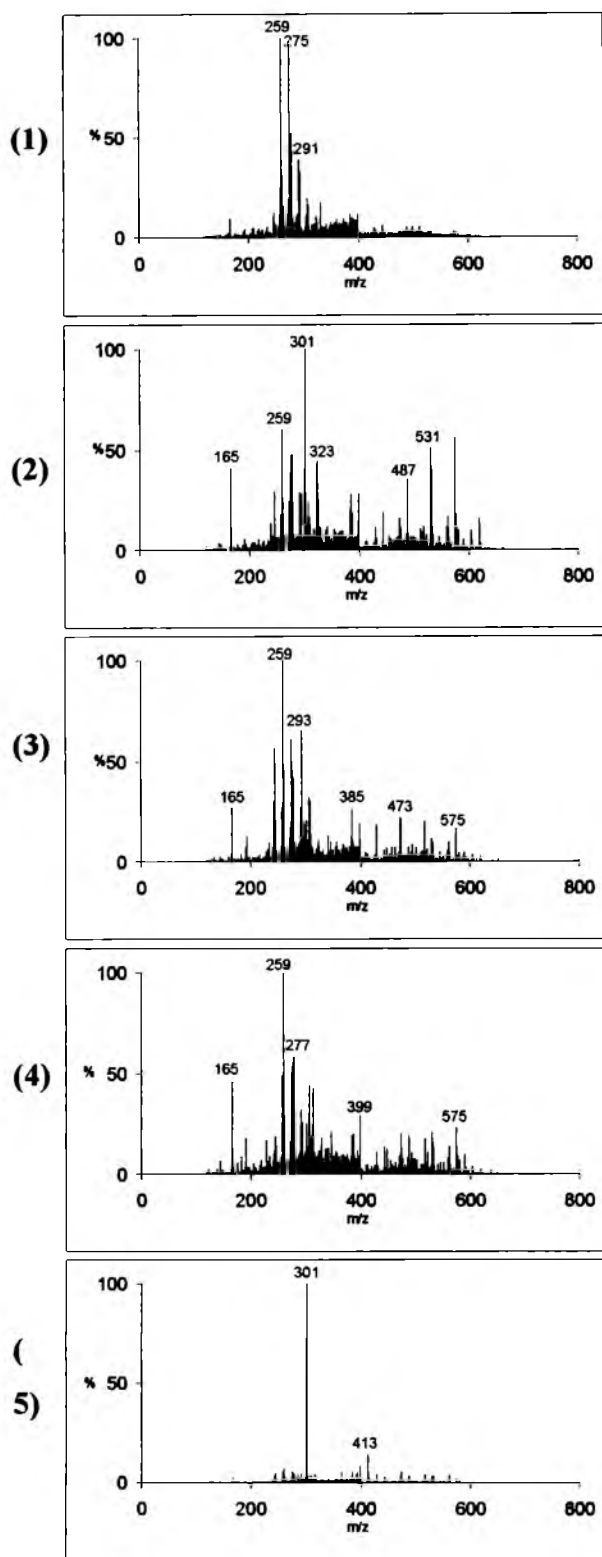


(a)

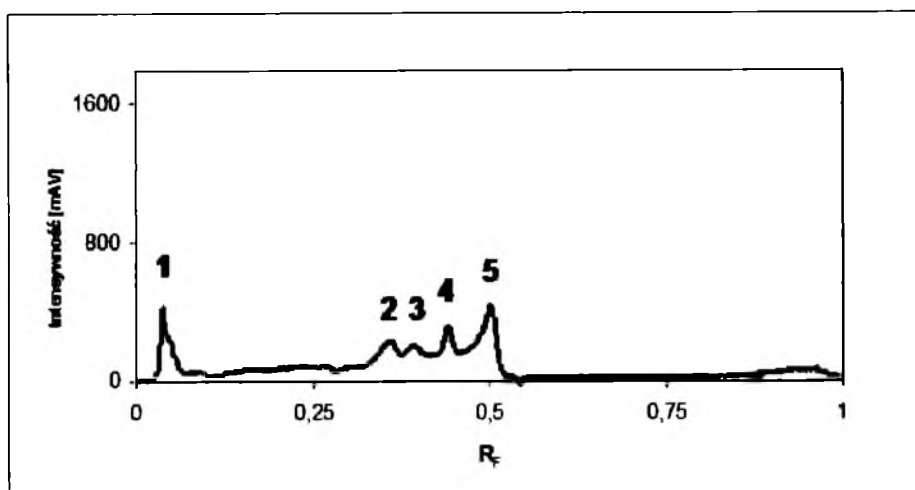


(b)

Rys. 48. Densytogram (a) oraz wideoscan (b) dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia hians* (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza ruchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 15  $\mu\text{L}$ ; temperatura  $-10^\circ\text{C}$ ; droga rozwijania 15cm)



Rys. 49. Widma masowe (1-5) zarejestrowane dla pięciu rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z olejku eterycznego *Salvia hians*, wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

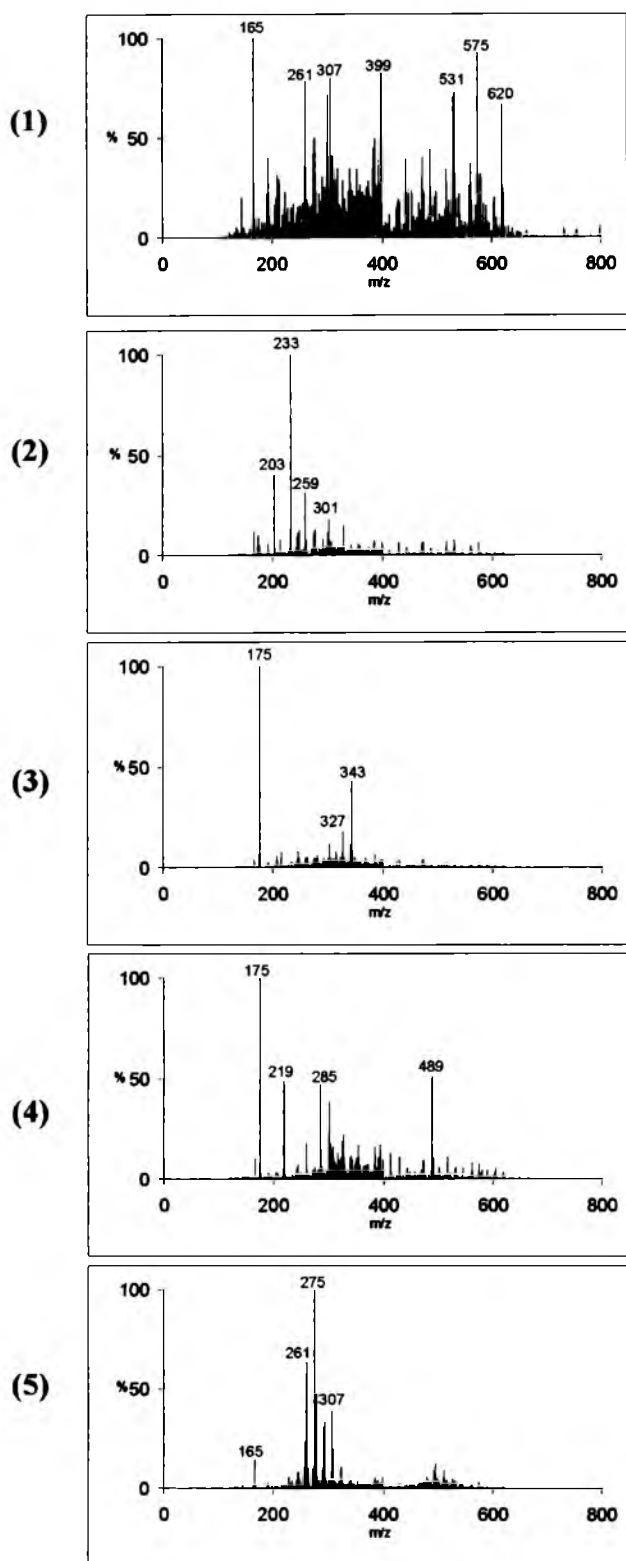


(a)

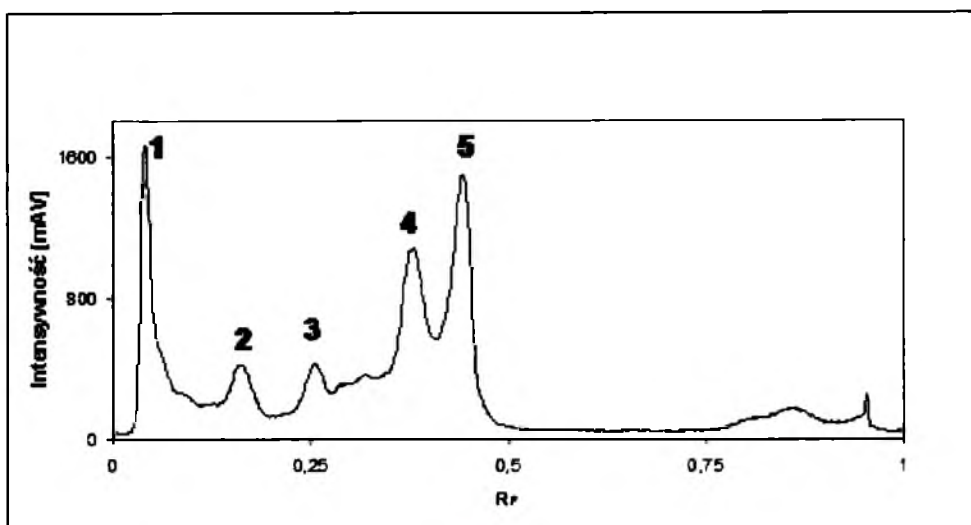


(b)

Rys. 50. Densytogram (a) oraz wideoscan (b) dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia triloba* (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza ruchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 15  $\mu\text{L}$ ; temperatura  $-10^\circ\text{C}$ ; droga rozwijania 15cm)



Rys. 51. Widma masowe (1-5) zarejestrowane dla pięciu rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z olejku eterycznego *Salvia triloba*, wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatkowo 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)



(a)

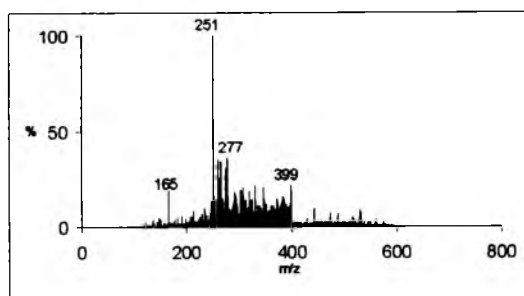


(b)

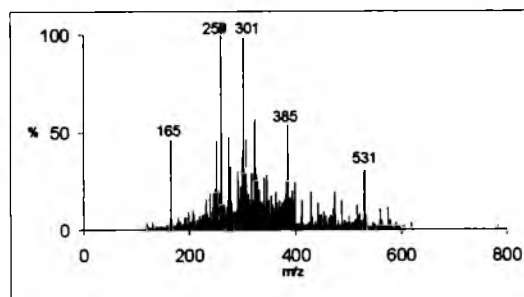
Rys. 52. Densytogram (a) oraz wideoscan (b) dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia nemorosa* (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza ruchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 15  $\mu\text{L}$ ; temperatura  $-10^\circ\text{C}$ ; droga rozwijania 15cm)



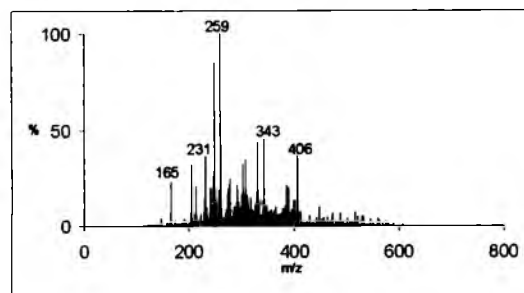
(1)



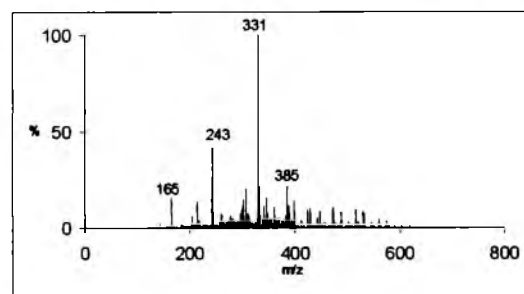
(2)



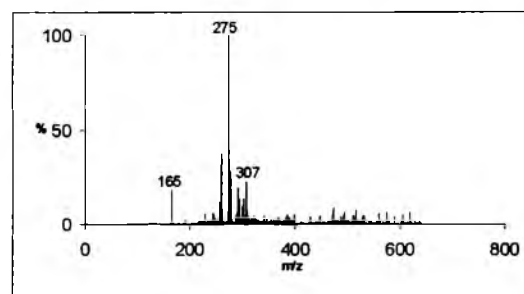
(3)



(4)



(5)



Rys. 53. Widma masowe (1-5) zarejestrowane dla pięciu rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z olejku eterycznego *Salvia nemorosa*, wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

Na podstawie wizualnego porównania przedstawionych wyników można stwierdzić, że densytogramy i spektra masowe olejków eterycznych różnych gatunków roślin należących do rodzaju *Salvia* znacznie różnią się pod względem składu chemicznego. Na uwagę zasługują indywidualne zestawy widm masowych, zarejestrowane dla różnych gatunków szalwii. Można zauważyć, że widma masowe pasma o najwyższej wartości  $R_F$  (tj. odpowiednio frakcji nr 5 na rys. 47, 49, 51 i 53) dostarczają znacznie prostszych „fingerprintów” niż te, które znajdują się bliżej linii startu. W przypadku próbki olejku *Salvia lavandulifolia* (rys. 44a) tej prawidłowości nie zaobserwowano ze względu na fakt, że odpowiednie spektrum masowe nr 4 zarejestrowano dla sumy dwóch słabo rozdzielnych frakcji. Te charakterystyczne obserwacje zostały potwierdzone wieloma powtórzeniami eksperymentu TLC-MS. To pokazuje, że każdy z badanych olejków prawdopodobnie zawiera więcej związków bardziej polarnych (np. terpenoidów), które są silniej zatrzymywane na powierzchni adsorbenta, niż tych o niskiej polarności (np. terpeny), które uzyskują wyższe wartości  $R_F$ . Jest jednak również możliwe, że mniej polarne komponenty badanych olejków eterycznych (frakcja 5 na rys. 47, 49, 51 i 53) są słabiej adsorbowane na warstwie żelu krzemionkowego i tym samym, w temperaturze pokojowej odparowują lub sublimują z płytki jeszcze przed elucją poszczególnych pasm chromatograficznych i przed zarejestrowaniem widm MS.

W przeciwieństwie do wyników rozdziału z udziałem techniki GC/MS, analiza TLC w większości przypadków nie może zapewnić identyfikacji poszczególnych składników, ze względu na niewystarczające zdolności rozdzielcze tej metody w odniesieniu do złożonych mieszanin, jakimi niewątpliwie są olejki eteryczne. We wcześniejszych pracach [106, 107] opisanych w rozdziale 1 i 2 zaprezentowano wyniki badań z użyciem GC/MS olejków eterycznych pochodzących z różnych gatunków szalwii. W tamtych przypadkach identyfikacja poszczególnych związków była możliwa dzięki cyfrowej bibliotece widm masowych *NIST* oraz porównaniu czasów retencji analizowanych substancji. Zastosowanie w niniejszym eksperymencie wzorców zewnętrznych również nie przyniosłoby zadowalających rezultatów. W tych okolicznościach, różnorodność uzyskanych widm masowych dla każdej rozdzielonej frakcji i jednocześnie powtarzalność samego eksperymentu można uznać za pewien znaczący sukces.

W przypadku tak złożonych „fingerprintów”, jak w omawianym przypadku (składających się z densytogramów i widm masowych), oczywistym jest, że bogactwo

istotnych informacji, które są zakodowane w poszczególnych „odciskach palca”, w dużej mierze umyka kontroli i ocenie wzrokowej, a więc kontrola i ocena wzrokowa mają niewielkie znaczenie analityczne. Skuteczna ekstrakcja informacji może być dokonana jedynie przy użyciu metod chemometrycznych, jak to zostało wykazane w publikacji [120], gdzie umieszczono wyczerpujące informacje na temat analizy sygnałów instrumentalnych (np. chromatograficznych fingerprintów) oraz badania różnic między nimi (m.in. przy pomocy analizy czynników głównych - PCA).

Na podstawie wyników niniejszego eksperymentu można sformułować następujące wnioski:

- Metoda badania olejków eterycznych z użyciem niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC) jest w pełni powtarzalna, a rozdzielone pasma mogą być analizowane przy pomocy spektrometrii mas;
- Nawet w przypadku braku aparatury GC/MS (dedykowanej analizie lotnych związków organicznych), chromatografia cienkowarstwowa sprzężona ze spektrometrią masową (TLC-MS) może być wykorzystywana do konstruowania „fingerprintów” złożonych mieszanin;
- Bezpośrednie połączenie chromatografii cienkowarstwowej ze spektrometrią mas (TLC-MS) zapewnia wielowymiarowe fingerprinty, które mogą lepiej scharakteryzować badaną próbkę, niż „fingerprinty” pojedyncze (np. tylko densytometryczne);
- Złożone „fingerprinty” materiału roślinnego dostarczają wielowymiarowych danych, które mogą okazać się przydatne do celów chemotaksonomicznych przy wsparciu metodami chemometrycznymi.

## **7. Analiza olejków eterycznych szalwii (*Salvia* L.) przy pomocy niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z detekcją masową (LT-TLC-MS) w wariancie jedno- i dwuwymiarowym**

We wcześniejszym eksperymencie [116], opisywanym w rozdziale 5 części doświadczalnej niniejszej pracy, zaproponowałem niskotemperaturową chromatografię cienkowarstwową (LT-TLC) do analizy frakcji lotnej pochodzącej z różnych gatunków roślin należących do rodzaju szalwii (*Salvia* L.). Po raz pierwszy tę technikę wykorzystano w pracy [121] do badania lotnych związków pochodzących z materiału botanicznego i wykazano, że może ona stanowić alternatywę wobec bardziej kosztownej metody, jaką jest chromatografia gazowa (GC). Metoda ta została opisana przez Koch i in. [117, 119], gdzie również zastosowano ją do analizy olejków eterycznych zawartych w roślinach. Jako niezaprzeczalne zalety techniki niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC) należy wymienić jej prostotę i możliwość łatwego i szybkiego konstruowania fingerprintów materiału botanicznego. Może być ona wykorzystywana do wielu różnych celów, m. in. do kontroli jakości handlowych partii roślin leczniczych, będących w sprzedaży.

Stosunkowo niedawno firma CAMAG (Muttens, Szwajcaria) wprowadziła interfejs TLC-MS, który umożliwia proste połączenie techniki chromatografii cienkowarstwowej ze spektrometrią masową. W poprzednim rozdziale [122] zaprezentowano możliwość równoczesnego wykorzystania niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC) z detekcją densytometryczną, jak również niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją masową (LT-TLC-MS). Miało to na celu uzyskanie binarnych „odcisków palca” z różnych gatunków szalwii (*Salvia* L.). W eksperymencie tym równolegle zastosowano dwa detektory (densytometryczny i spektrometrii masowej).

Eksperyment przedstawiony w niniejszym rozdziale dotyczył analizy olejku eterycznego pochodzącego z *Salvia lavandulifolia* z zastosowaniem wariantu jednowymiarowego chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej ze spektrometrem mas (1D LT-TLC-MS). Kolejnym etapem opisywanych badań było wprowadzenie wariantu dwuwymiarowego chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej z chromatografem cieczowym i spektrometrem mas (2D LT TLC-LC-MS). W celu ominięcia konieczności stosowania elucji gradientowej, jaką wykorzystuje się w analizie złożonych mieszanin metodą chromatografii gazowej (GC), czy

wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), zaproponowano wstępną separację na mniej złożone grupy związków techniką niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (LT-TLC). Następnie zastosowano połączenie „off-line” poprzez interfejs TLC-MS z wysokosprawnym chromatografem cieczowym (HPLC) wyposażonym w detektor spektrometrii mas. W ten sposób udało się zaproponować nowy dwuwymiarowy system (2D LT-TLC-LC-MS) i porównano go z prostszym systemem jednowymiarowym (1D LT-TLC-MS) na przykładzie olejku eterycznego pochodzącego z *Salvia lavandulifolia*. W wyborze tego konkretnego gatunku szalwii kierowano się jego uznanymi właściwościami leczniczymi, a także wysoką zawartością olejku eterycznego [123].

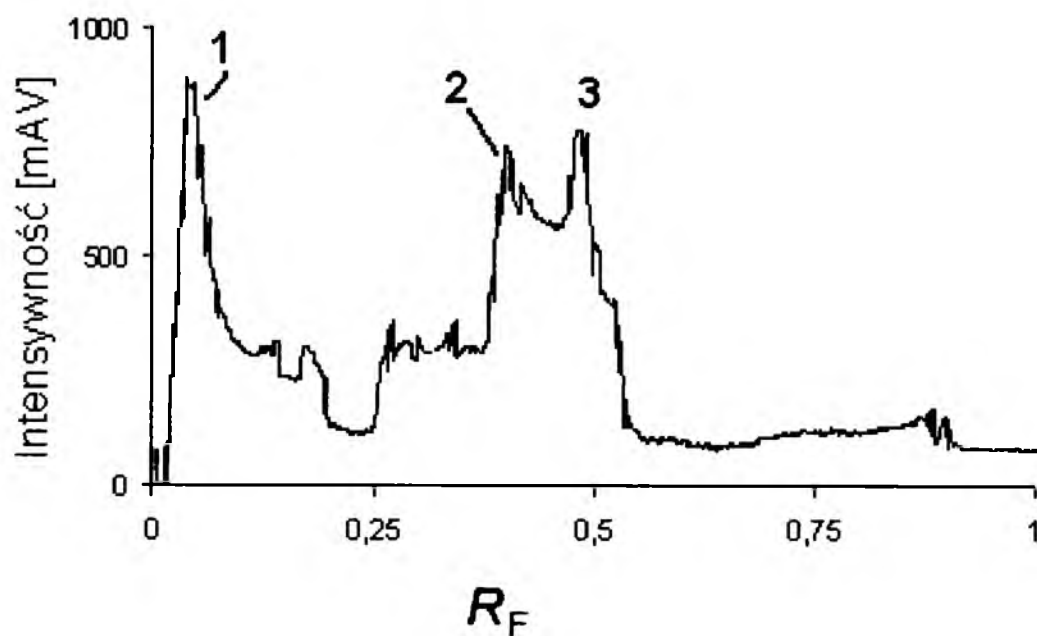
Skład chemiczny olejku eterycznego pochodzącego z *Salvia lavandulifolia* był przedmiotem analizy wielu grup badawczych [106, 107, 124-134]. Przegląd literatury na ten temat przedstawiono w Tab. 12. Jak wynika z informacji w niej zebranych, znaczna ilość różnych terpenów i terpenoidów o masie cząsteczkowej od ok. 100 do 500 Da została zidentyfikowana we frakcji lotnej tego gatunku szalwii. Masy cząsteczkowe związków występujących w oleju *Salvia lavandulifolia* (Tab. 12) umożliwiły głębszy wgląd w widma masowe zarejestrowane dla rozdzielonych frakcji.

Tab. 12. Przegląd literaturowy dotyczący zawartości poszczególnych terpenów i terpenoidów w olejku eterycznym *Salvia lavandulifolia* wraz z ich wzorami sumarycznymi oraz masami cząsteczkowymi

Chemiczna klasa związków	Związek i jego wzór sumaryczny	Masa cząsteczkowa	Literatura
Monoterpeny	$\alpha$ -Pinen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[106, 107, 124-127]
	$\beta$ -Pinen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	
	Kamfen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[127-129]
	$\beta$ -Mircen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[106, 107, 125, 127]
	Sabinen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[125, 127]
	$\alpha$ -Tujen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	
	$\alpha$ -Terpinen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[125-127]
	$\gamma$ -Terpinen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[125-127]
	Tricyklen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[125]
	<i>p</i> -Cymen; C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134,22	[125-127]
	$\alpha$ -Terpinolen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	
	$\beta$ - <i>trans</i> -Ocymen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[106, 107]
	<i>cis</i> -Ocymen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	
	$\tau$ -Terpinen; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[106, 126, 127]
	<i>p</i> -Menta-1,4-dien; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	[106, 107]
Seskwiterpeny	$\beta$ -Chamigren; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	[106, 107]
	Cadina-3,9-dien; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\gamma$ -Cadinen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	[125, 127]
	$\beta$ -Cadinen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	Cadina-1,4-dien; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	Aromadedren; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	Sativen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -Humulen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	Farnesen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	Cloven; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -Kurkumen; C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202,33	
	$\gamma$ -Selenin; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	

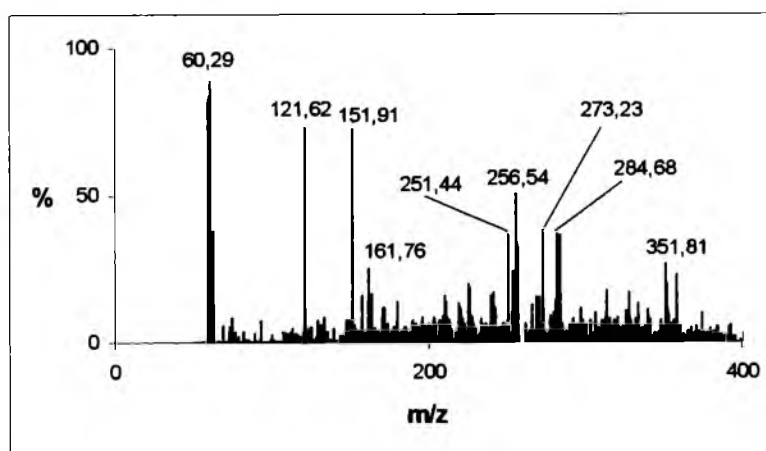
	Leden; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -Muurolen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -, $\beta$ -Cubeben; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -Copaen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -Gurjunen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
	$\alpha$ -Ylangen; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204,35	
Monoterpenoidy	Tujol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,14	[106, 107]
	$\alpha$ -, $\beta$ -Tujon; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,23	[106, 107, 125, 127]
	Eukaliptol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,25	[106, 107, 124-129]
	Kamfora; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,23	
	Borneol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,14	
	Bornan-2,5-dion; C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	166,10	[125]
	Linalool; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,23	[124, 126, 127, 129]
	Octan bornylu; C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196,29	[106, 107, 124, 125, 127]
	Propionian bornylu; C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	210,31	[125]
	Octan sabinyłu; C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	194,27	[130]
	<i>cis</i> -Sabinen (hydrat); C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,23	[125, 127]
	Pinokamfon; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,23	[125]
	Izopinokamfon; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152,23	
	Octan linallyłu; C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196,29	[127, 129]
	$\alpha$ -Terpineol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154,23	[125-127]
	Terpinen-4-ol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		
Seskwiterpenoidy	Viridiflorol; C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	[125, 127, 128]
	Kariofilen (tlenek); C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220,34	[124-127]
Diterpenoidy	Galdosol; C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	344	[132]
Triterpenoidy	Kwas oleanolowy; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456,70	[131, 133]
	Kwas mikromerowy; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456,70	[131]
	Kwas 2-alfa-3-beta-dihydroksyoleinolowy (z ang. <i>maslinic acid</i> – MA); C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	472,70	
	3-epi-MA; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	472,70	
	Kwas ursolowy; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456,70	[131-133]

Na rys. 54 pokazano densytogram zarejestrowany dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia* oraz na rys. 55 zamieszczono widma masowe (1-3) zarejestrowane dla trzech rozdzielonych pasm chromatograficznych wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów. Wyniki te pochodzą z jednowymiarowego wariantu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z detektorem spektrometrii masowej (1D LT-TLC-MS).

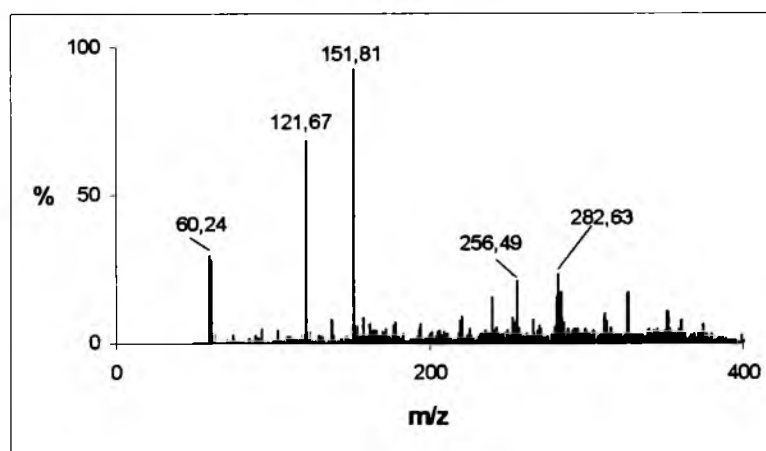


Rys. 54. Densytogram dla chromatogramu olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia* (faza stacjonarna:  $\text{SiO}_2$ , faza ruchoma: toluen - octan etylu (95:5, v/v); próbki naniesiono w ilości 15  $\mu\text{L}$ ; temperatura  $-10^\circ\text{C}$ ; droga rozwijania 15cm)

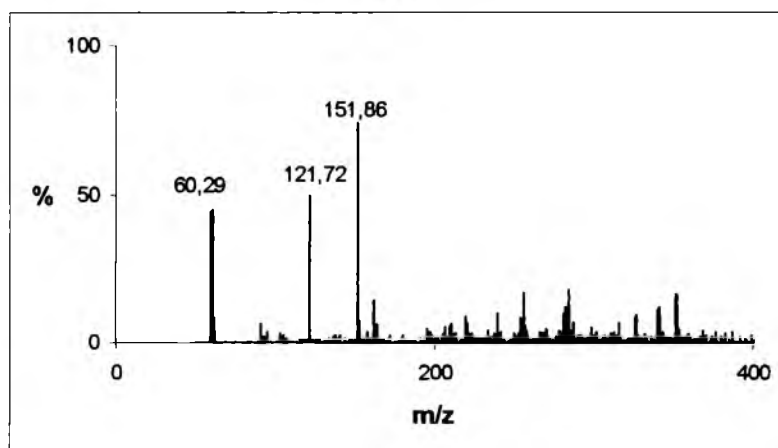




(a)



(b)



(c)

Rys. 55. Widma masowe (a-c) zarejestrowane dla trzech rozdzielonych pasm chromatograficznych, pochodzących z olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia*, wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

Przy złożonych mieszaninach (takich, jak np. olejki eteryczne) adsorpcyjna chromatografia cienkowarstwowa może zapewnić tylko wstępną separację, dzieląc wszystkie składniki na grupy związków o podobnej polarności. W opisanym przypadku, pasmo chromatograficzne 1 zawiera komponenty posiadające najniższą wartość współczynnika  $R_F$  (równą 0,05), a tym samym najprawdopodobniej zawiera związki o najwyższym powinowactwie do adsorbenta i o najwyższej polarności. Związki należące do grupy 2 ( $R_F = 0,39$ ) odznaczają się średnim powinowactwem do adsorbenta, natomiast te, które znajdują się w paśmie 3 ( $R_F = 0,49$ ) charakteryzują się najniższym powinowactwem do adsorbenta. Jednak między pasmami 2 i 3 istnieje stosunkowo niewielka różnica w wartościach współczynnika opóźnienia ( $\Delta R_F (3-2) = 0,10$ ), co sugeruje, że te dwie frakcje mogą zawierać związki o podobnej strukturze, a dokładniej, że są mieszaniną różnych monoterpenu i/lub seskwiterpenu, rzadziej terpenoidów.

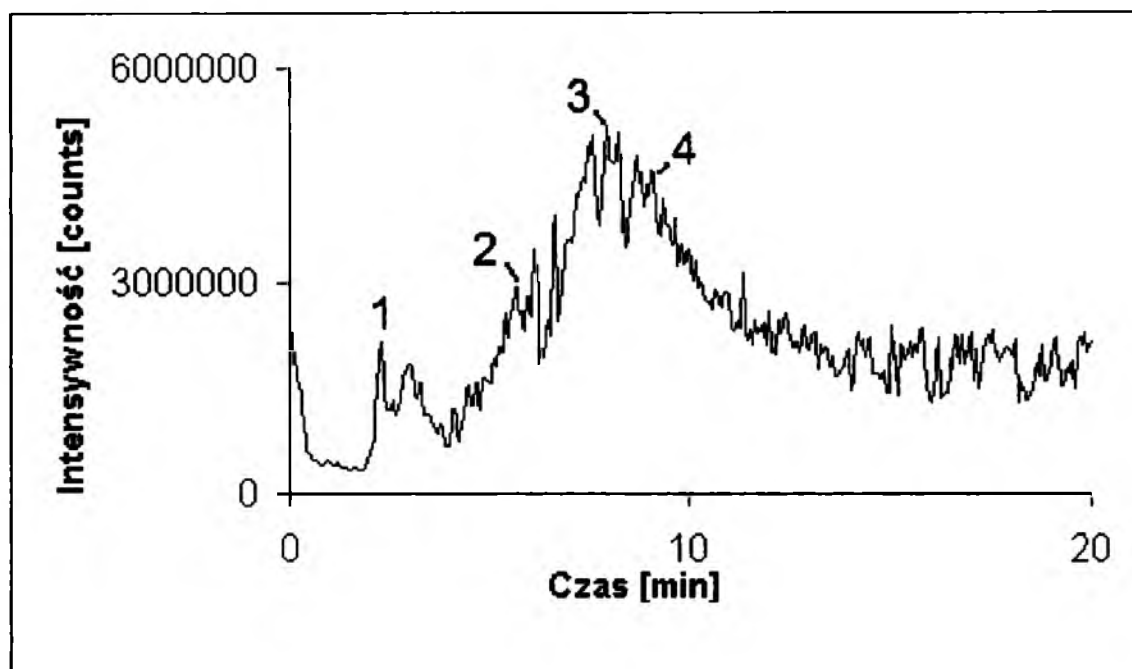
Na podstawie wizualnego porównania przedstawionych wyników można stwierdzić, że frakcja 1 (rys. 55a) jest bardziej złożoną mieszaniną, niż pasma 2 i 3 (rys. 55b,c), a co więcej, wiele sygnałów znajdujących się na trzecim widmie masowym (rys. 55c), nie posiada jonów macierzystych, lecz w dużej mierze wynikają one z fragmentacji, przekształceń strukturalnych, czy łączenia się pierwotnych związków i/lub jonów. Ponadto, wydaje się uzasadnione, aby twierdzić, że część komponentów z najwyższym powinowactwem do adsorbenta (frakcja 1) stanowiła w dużej mierze polarne monoterpenu czy seskwiterpenowe pochodne zawierające tlen (takie, których wartości  $m/z$  wahają się od 152,23 do 210,31, a także wyższych, niż 220,34; Tab. 12.). Sygnały o wartości  $m/z$  wyższej od 250 można przypisać nieco cięższym tlenowym pochodnym diterpenowym lub triterpenowym. Jony odpowiadające niższym wartościom  $m/z$  (60, 121 i 152) są źródłem pewnych informacji odnośnie do charakteru chemicznego związków, nie są jednak wystarczające do prawidłowej identyfikacji.

Na rys. 55 b i c pokazano widma masowe pozostałych dwóch frakcji (2 i 3), zawierające związki o mniejszym powinowactwem do adsorbenta niż te, które znajdują się w paśmie 1. Ich odpowiednie składy chemiczne są mniej złożone niż frakcji 1, co wynika bezpośrednio z mniejszej liczby sygnałów. Frakcje 2 i 3 mogą w znacznym stopniu stanowić mieszaninę cięższych terpenów i lżejszych terpenoidów.

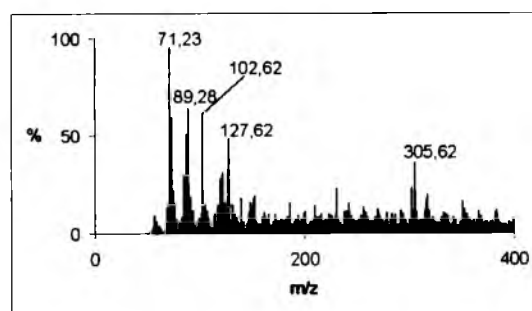
Kolejnym etapem niniejszego eksperymentu było wprowadzenie do badań wysokosprawnego chromatografu cieczonego (HPLC). Każdą frakcję eluowano przy pomocy interfejsu TLC-MS do kolumny chromatografu cieczonego i w dalszej części następował drugi etap rozdziału techniką HPLC. Olejek eteryczny pochodzący z *Salvia*

*lavandulifolia* zawiera wiele terpenów i terpenoidów, które mogą występować również w postaci izomerycznej. Ze względu na identyczne wartości  $m/z$  jonów pochodzących od tej samej grupy izomerów, nie mogą one być łatwo rozdzielone przy użyciu uniwersalnego systemu chromatografii cieczowej z detekcją masową. W rezultacie zastosowanie dwuwymiarowego wariantu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z chromatografią cieczową z detekcją spektrometrii mas (2D LT-TLC-LC-MS) również nie zapewnia pełnej separacji związków zawartych we frakcjach 1-3 (densytogram na rys. 54).

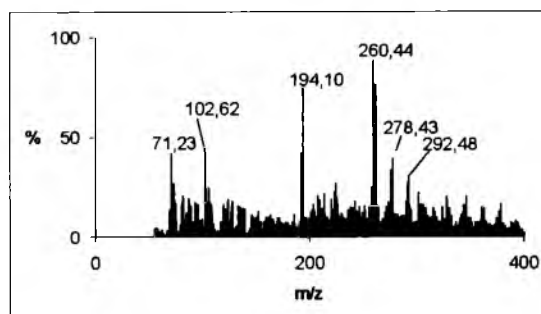
Na rys. 56, 58 i 60 przedstawiono chromatogramy cieczowe uzyskane przy pomocy dwuwymiarowego układu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z chromatografem cieczowym z detektorem spektrometrii mas (2D LT-TLC-LC-MS) dla mieszanin związków zawartych we frakcjach 1-3 (rys. 54), wstępnie rozdzielonych przy pomocy LT TLC. Każdy z tych trzech chromatogramów został zarejestrowany w systemie pozytywnej jonizacji. Następnie dla poszczególnych profili stężeniowych zarejestrowano widma masowe, które przedstawiono na rys. 57a-d, 59a-d i 61a-c.



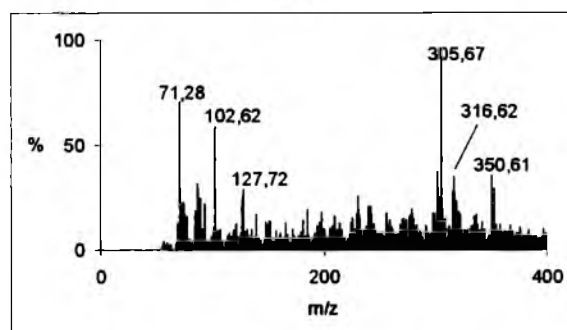
Rys. 56. Chromatogram ciekowy zarejestrowany dla frakcji 1 (rys. 54) wyodrębnionej w układzie niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z chromatografem ciekowym z detektorem spektrometrii mas (2D LT-TLC-LC-MS) (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol, przepływ 0,20 mL min<sup>-1</sup>, czas analizy: 20 minut)



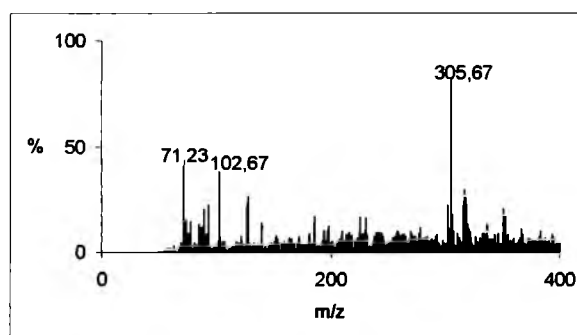
(a)



(b)

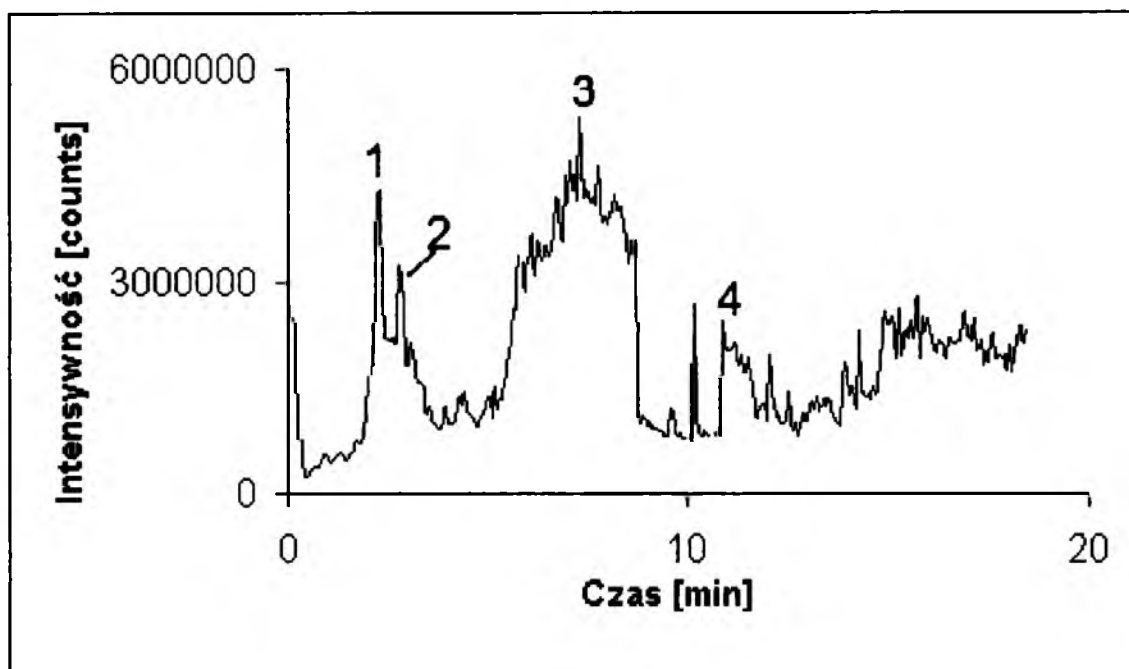


(c)

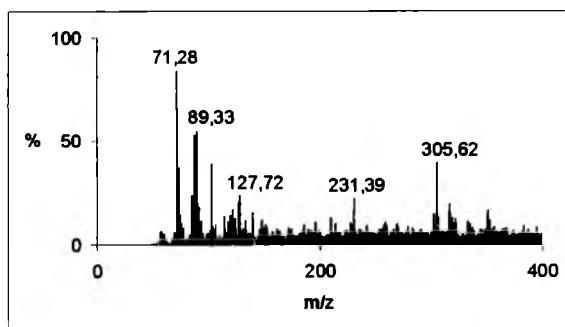


(d)

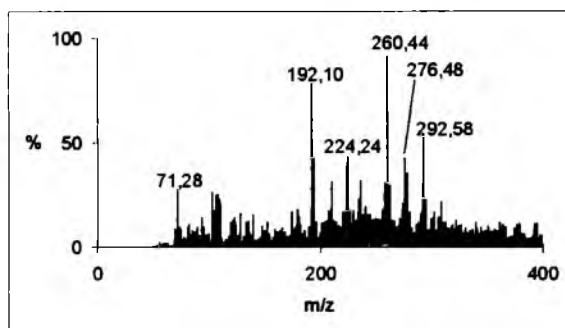
Rys. 57. Widma masowe (a-d) zarejestrowane dla czterech profili stężeniowych z chromatogramu cieczowego frakcji 1 (rys. 56) wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)



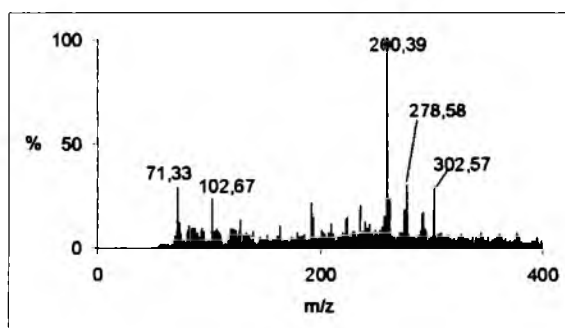
Rys. 58. Chromatogram cieczerw zarejestrowany dla frakcji 2 (rys. 54) wyodrębnionej w układzie niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z chromatografem cieczerw z detektorem spektrometrii mas (2D LT-TLC-LC-MS) (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol, przepływ 0,20 mL min<sup>-1</sup>, czas analizy: 20 minut)



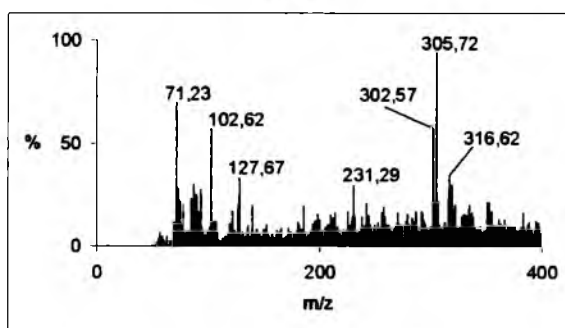
(a)



(b)

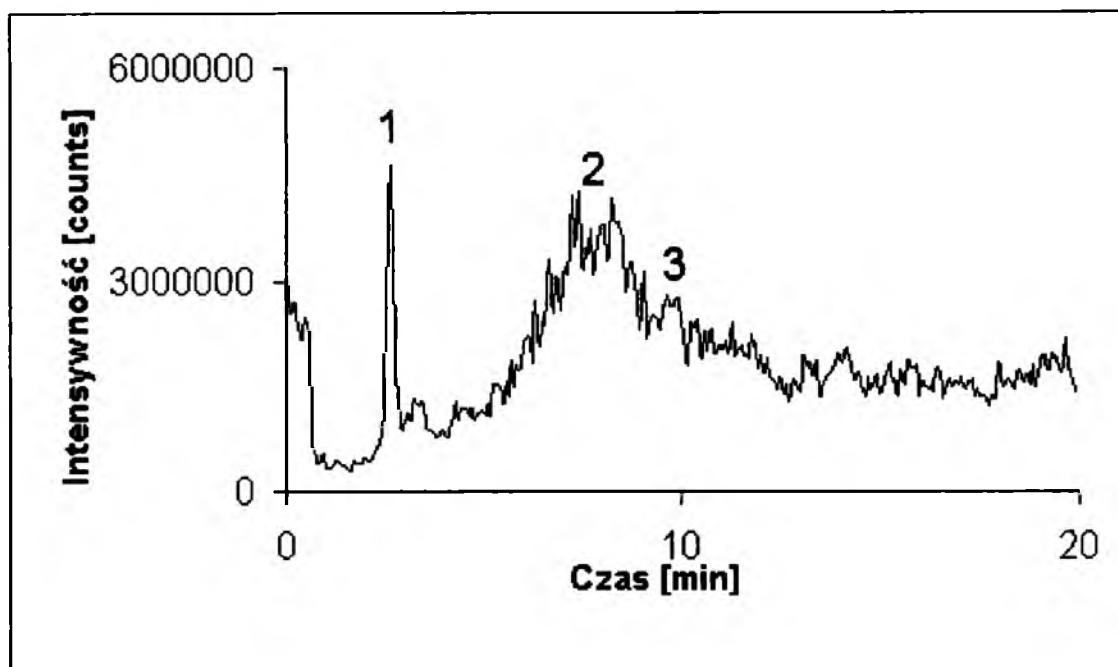


(c)



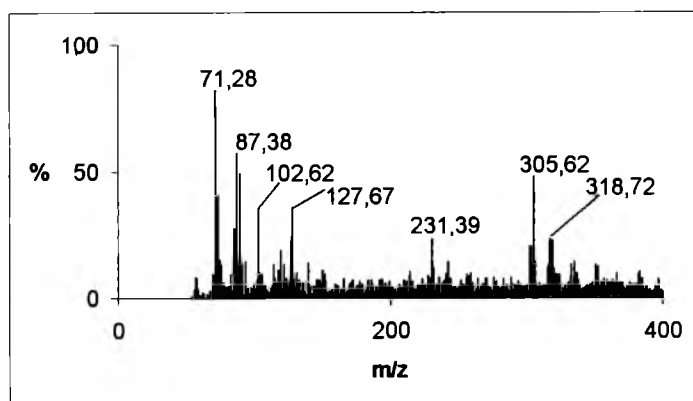
(d)

Rys. 59. Widma masowe (a-d) zarejestrowane dla czterech profili stężeniowych z chromatogramu cieczonego frakcji 2 (rys. 56) wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

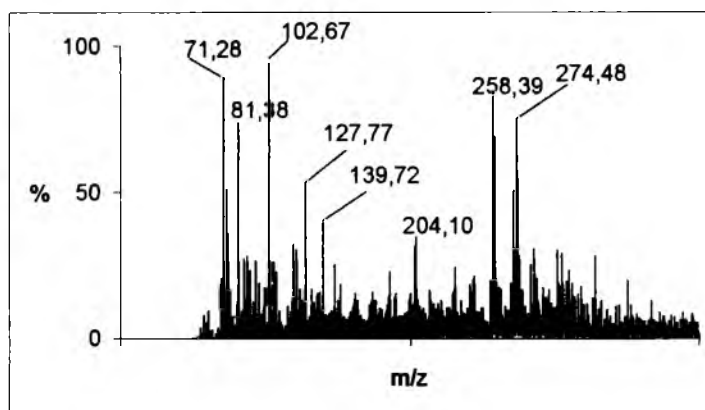


Rys. 60. Chromatogram ciekłowy zarejestrowany dla frakcji 3 (rys. 54) wyodrębnionej w układzie niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej połączonej z chromatografem ciekłym z detektorem spektrometrii mas (2D LT-TLC-LC-MS) (spektrometr mas (MS) Varian 500-MS, kolumna Varian, typu Pursuit XRs-C18; wymiary 50 mm × 2 mm; grubość ziarna 3 μm; faza ruchoma: metanol, przepływ 0,20 mL min<sup>-1</sup>, czas analizy: 20 minut)

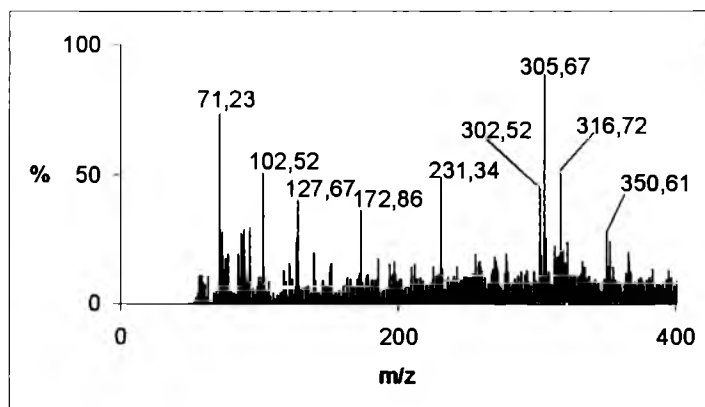




(a)



(b)



(c)

Rys. 61. Widma masowe (a-c) zarejestrowane dla trzech profili stężeniowych z chromatogramu cieczowego frakcji 3 (rys. 56) wraz z wartościami  $m/z$  dominujących sygnałów (ESI-MS, temp. komory jonizacji dodatniej 45°C; ciśnienie 25Pa; napięcie kapilary 70V; prędkość przepływu fazy ruchomej 0,2 mL/min)

Na potrzeby analizy opisywanej w niniejszym rozdziale połączono niskotemperaturową chromatografię cienkowarstwową (LT-TLC-MS) w normalnym układzie faz (adsorbent - żel krzemionkowy) z chromatografią cieczową w układzie z odwróconymi fazami (kolumna C18). Suma rozdzielonych pasm chromatograficznych pokazanych na rys. 56, 58 i 60 jest większa niż na densytogramie (rys. 54). Tak więc, stosowanie wariantu dwuwymiarowego (2D LT-TLC-LC-MS) dostarcza dokładniejszych informacji na temat składu złożonej mieszaniny, niż w przypadku wariantu jednowymiarowego. Uzyskane wyniki dla badanej próbki olejku *Salvia lavandulifolia* można traktować jako unikalne fingerprinty, zwłaszcza w przypadku braku substancji wzorcowych, co często jest wystarczające nawet do badań fitochemicznych.

Jeżeli spektra masowe zostaną poddane głębszej analizie (rys. 57a-d, 59a-d i 61a-c), to wówczas zauważymy w nich obecność pewnych sygnałów, które są charakterystyczne praktycznie dla wszystkich widm pochodzących z trybu (2D LT-TLC-LC-MS), natomiast są nieobecne w widmach wariantu jednowymiarowego (1D LT-TLC-MS) (rys. 55a-c). Te sygnały prawdopodobnie mogą być związane z jednostką izoprenową, a ich wartości  $m/z$  są równe 71, 87, 89 i 126. Sygnały te można prawdopodobnie przypisać następującym jonom:  $[C_5H_8 + H + He]^+$ ,  $[C_5H_8 + H_2O + H]^+$ ,  $[C_5H_8 + H_2O + H + He]^+$ ,  $[C_5H_8 + H + He + MeOH]^+$ . Z tej obserwacji wynika również, że wariant dwuwymiarowy jest bardziej destrukcyjny od wariantu jednowymiarowego.

Wiele terpenów w wyniku jonizacji może dostarczyć bardzo podobne widma masowe, ze względu na podobieństwa strukturalne, czy sposób fragmentacji. W związku z tym identyfikacja terpenów oparta wyłącznie na interpretacji widm masowych nie jest zbyt dokładna, zwłaszcza w przypadku złożonych mieszanin. Jak wynika z literatury [134], olejki eteryczne pochodzące z rodzaju *Salvia* są stosunkowo bogate w diterpenoidy typu abietanu, o masach cząsteczkowych zawartych w przedziale od 240 do 344 Da (Tab. 12.) oraz w triterpenoidy o odpowiednich masach cząsteczkowych w przedziale od 427 do 473 Da. Można więc przypuszczać, że liczne sygnały obecne w widmach masowych pochodzą z fragmentacji tych cięższych frakcji. Ponadto można spekulować, że sygnał o wartości  $m/z = 316$  (obecny na rys. 57b, 59d i 61c) może pochodzić od jonu  $[344 - CO]^+$  lub  $[344 + He - 2CH_3]^+$ , natomiast sygnał  $m/z = 350$  (obecny na rys. 57c i 61c) może pochodzić od jonu  $[344 + H + He + H_2O - CH_3]^+$ . W większości widm masowych obserwowany jest sygnał przy wartości  $m/z = 305$  (rys. 57a, b, c; 59 a, d, i 61a, c), który prawdopodobnie może pochodzić od jonów

$[350 - 3 \text{ CH}_3]^+$  lub  $[350 - 2\text{-propyl} - \text{He}]^+$ . Możliwe jest również, że sygnały  $m/z = 302$  i 305 (obecne w większości widm masowych) pochodzą od pewnych związków typu abietanu, które występują w roślinach z rodzaju *Salvia*. Bezpośrednia identyfikacja poszczególnych jonów macierzystych złożonej mieszaniny olejków eterycznych jest praktycznie niemożliwa. Można jedynie podjąć się orientacyjnej identyfikacji pewnych fragmentów molekularnych przez proste odejmowanie mas cząsteczkowych, choć ze względu na wiele kombinacji liczbowych należy podchodzić do tego problemu bardzo ostrożnie.

Na podstawie wyników niniejszego eksperymentu można sformułować następujące wnioski:

- Niskotemperaturowa chromatografia cienkowarstwowa (LT-TLC-MS) umożliwia sprawne frakcjonowanie olejków eterycznych, jak to wykazano na przykładzie olejku pochodzącego z *Salvia lavandulifolia*. Wykorzystanie interfejsu TLC-MS daje możliwość rejestracji widm masowych rozdzielonych frakcji. Jednakże identyfikacja poszczególnych związków, które są podobne strukturalnie (głównie terpeny i terpenoidy), a dodatkowo wiele z nich występuje w różnych odmianach izomerycznych, jest bardzo trudna;
- Aby częściowo złagodzić problem identyfikacji związków zawartych w złożonych mieszaninach pochodzenia naturalnego wprowadzono dwuwymiarową niskotemperaturową chromatografię cienkowarstwową połączoną z chromatografią cieczą z detekcją spektrometrii mas (2D LT-TLC-LC-MS). W ten sposób dwustopniowe frakcjonowanie złożonej mieszaniny olejku eterycznego z wykorzystaniem chromatografii cieczowej dostarczyło więcej informacji, niż te pochodzące z wariantu jednowymiarowego (2D LT-TLC-LC-MS);
- Na przykładzie olejku *Salvia lavandulifolia* przedstawionym w niniejszych badaniach, oszacowano jego skład jakościowy. Wykazano, że składniki badanego olejku mogą należeć do klasy mono-, seskwi-, di- i triterpenów, co zgadza się z danymi literaturowymi, zawartymi w Tab. 12. Fingerpriny pochodzące ze spektrometrii mas po zastosowaniu metod chemometrycznych, mogą dodatkowo służyć do identyfikacji i kontroli jakości partii handlowych roślinnych produktów leczniczych, sprzedawanych w aptekach, czy sklepach.

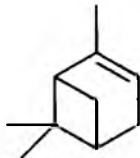
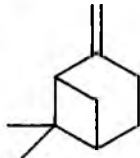
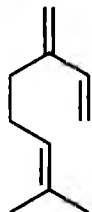
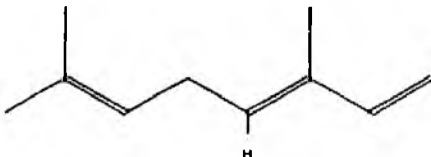
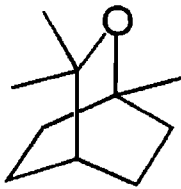
## 8. Analiza składu chemicznego olejków eterycznych szalwii z zastosowaniem spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz chromatografii gazowej z detekcją masową (GC/MS)

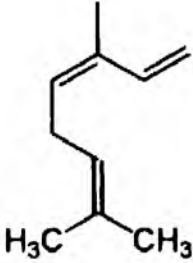
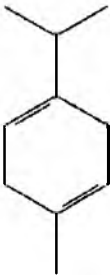
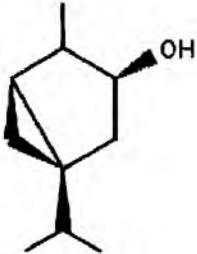
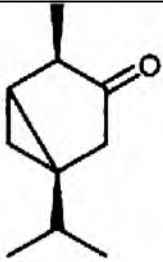
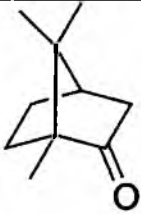
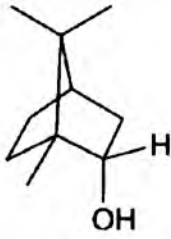
Techniką analityczną powszechnie stosowaną w przypadku analizy olejków eterycznych zawartych w roślinach jest chromatografia gazowa w wariacie *headspace* z detekcją masową (HS-GC/MS). Jednakże identyfikacja lotnych składników roślin to żmudne i niezwykle trudne zadanie, ze względu na złożoność próbek pochodzenia naturalnego oraz wysokie ceny substancji wzorcowych. W wielu przypadkach identyfikacja na podstawie biblioteki widm masowych, będącej na wyposażeniu systemu analitycznego, okazuje się niewystarczająca i dlatego wiele związków chemicznych występujących w olejkach eterycznych nadal pozostaje niezidentyfikowanych. Z tych powodów „fingerprinty” różnych frakcji pochodzących z materiału roślinnego są bardzo popularne i znalazły właściwe sobie miejsce w analizie fitochemicznej. Są one używane w botanice do porównania różnych gatunków należących do tego samego rodzaju, a w farmakognozji do oceny przydatności surowców roślinnych jako substancji leczniczych. Pomimo ogromnej popularności roślin należących do rodzaju *Salvia*, zarówno w medycynie tradycyjnej, jak również w wielu innych dziedzinach działalności człowieka, ich skład chemiczny nie został jeszcze dostatecznie zbadany.

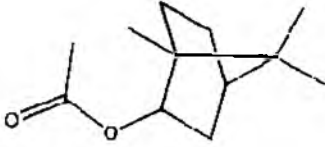
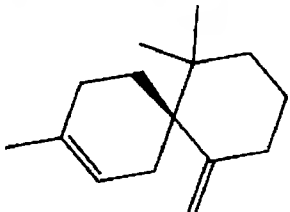
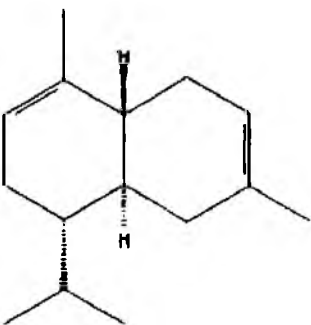
Wiadomo, iż technika spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego węgla  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  NMR) okazała się pomocnym narzędziem analitycznym w analizie złożonych mieszanin organicznych, w tym również pochodzących z materiału botanicznego [135-141]. Celem niniejszej analizy było zademonstrowanie przydatności spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego węgla  $^{13}\text{C}$  ( $^{13}\text{C}$  NMR), jak również chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją masową i dozownikiem próbek typu *headspace* (HS-GC/MS) do badania składu chemicznego lotnych frakcji zawartych w dwóch gatunkach szalwii (*Salvia lavandulifolia* i *Salvia triloba*).

Jak wynika z informacji podanych w Tab. 13, a także z wcześniejszych badań przedstawionych w publikacjach [106, 107], czternaście różnych związków lotnych zostało zidentyfikowanych w dwóch gatunkach szalwii, które stanowiły przedmiot niniejszej analizy.

Tab. 13. Lotne związki organiczne zidentyfikowane w dwóch gatunkach szalwii (*Salvia lavandulifolia* i *Salvia triloba*) pochodzących ze zbiorów w latach 2007 (07) i 2008 (08) wraz z odpowiednimi strukturami chemicznymi [106]

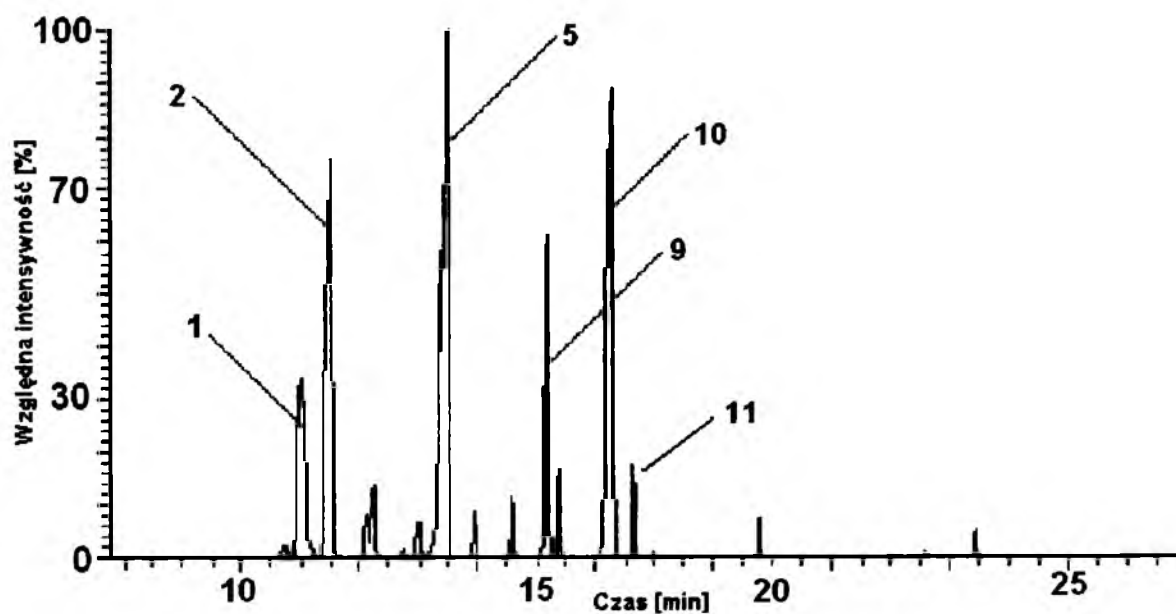
Nr	Lotny związek organiczny	Struktura chemiczna	Gatunek szalwii ( <i>Salvia</i> L.)
1	$\alpha$ -Pinen		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 07, 08
2	$\beta$ -Pinen		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 08
3	$\beta$ -Mircen		<i>lavandulifolia</i> 07, 08
4	$\beta$ -trans-Ocymen		<i>lavandulifolia</i> 07, 08
5	Eukaliptol		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 07, 08

6	cis-Ocymen		<i>lavandulifolia</i> 07
7	p-Menta-1.4-dien		<i>lavandulifolia</i> 07, 08
8	Thujol		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 08
9	Tujon		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 07, 08
10	Kamfora		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 07, 08
11	Borneol		<i>lavandulifolia</i> 07, 08

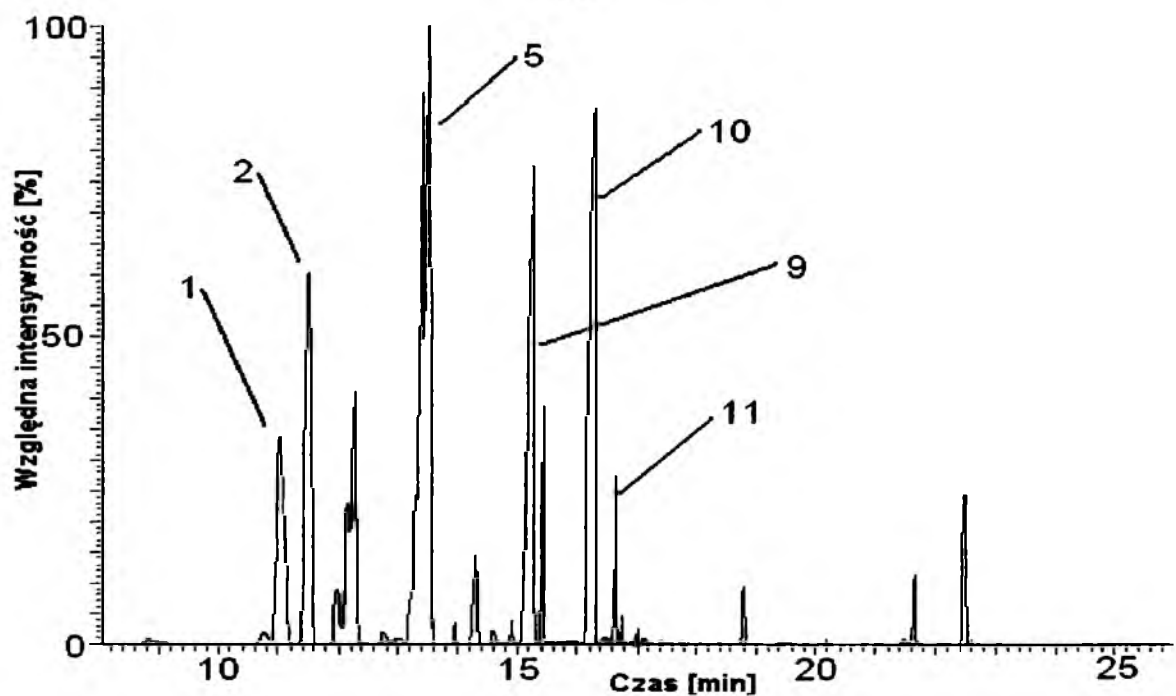
12	Octan bornylu		<i>lavandulifolia</i> 07, 08
13	$\beta$ -Chamigren		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 07, 08
14	Cadina-3,9-dien		<i>lavandulifolia</i> 07, 08 <i>triloba</i> 07, 08

$\beta$ -Mircen, który zidentyfikowano w *Salvia lavandulifolia* można uznać za marker chemotaksonomiczny, natomiast  $\beta$ -trans-ocymen i tujon, które również znaleziono w tym samym gatunku szalwii, można traktować jako wskaźniki chemotaksonomiczne [106]. Natomiast w *Salvia triloba* tujon wytypowano jako wskaźnik chemotaksonomiczny, który ma znaczenie podczas klasyfikacji gatunków roślin ze względu na ich skład chemiczny. Natomiast nie udało się ustalić markera chemotaksonomicznego, który byłby charakterystyczny tylko dla tego jednego gatunku szalwii [106].

Na rys. 62 i 63 pokazano chromatogramy olejków eterycznych *Salvia lavandulifolia* i *Salvia triloba*, pochodzących z dwóch różnych sezonów wegetacyjnych.



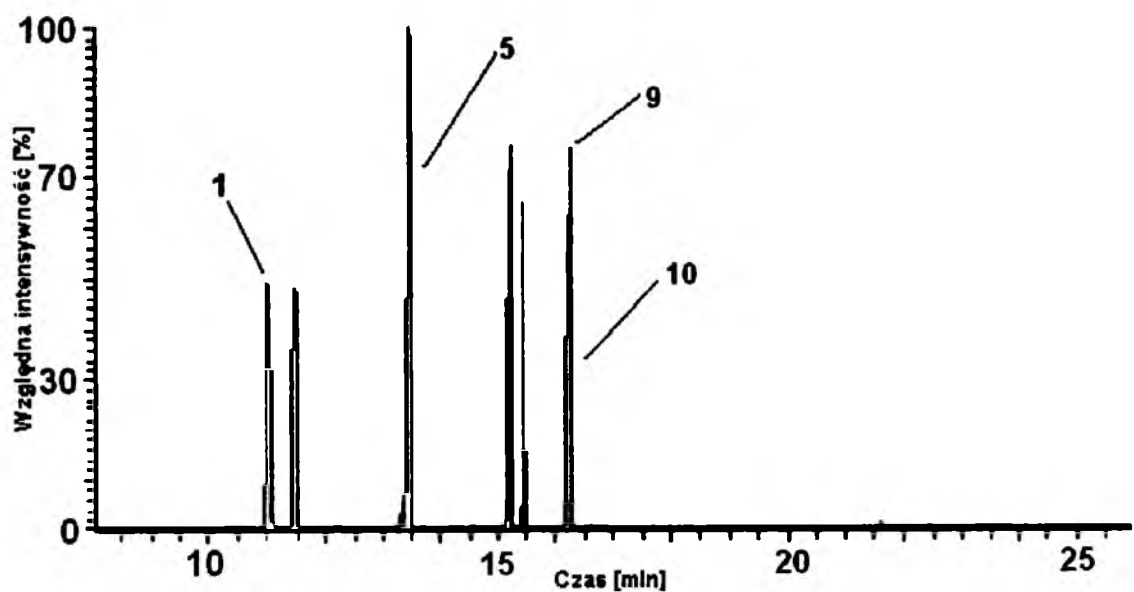
(a)



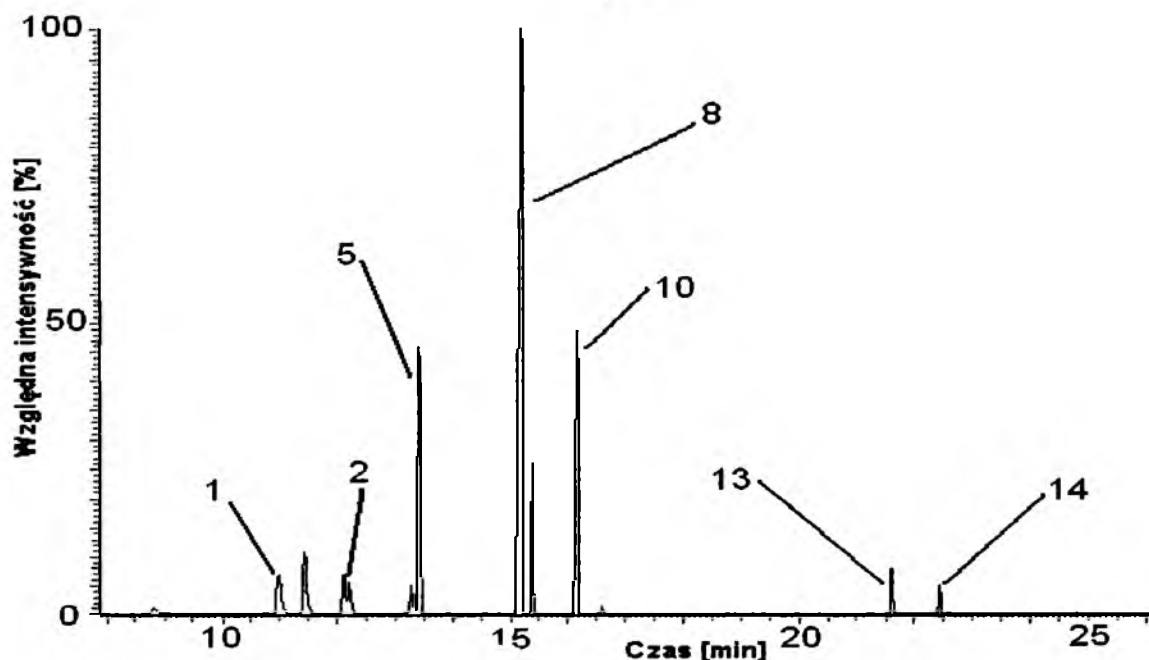
(b)

Rys. 62. Chromatogramy gazowe olejków eterycznych *Salvia lavandulifolia* pochodzących z dwóch różnych sezonów wegetacyjnych (a) 2007 i (b) 2008 roku [106]. Numery na chromatogramach odpowiadają zidentyfikowanym związkom lotnym, przedstawionym w Tab. 5. (HS-GC/MS; temperatura i czas desorpcji HS: odpowiednio 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa)





(a)



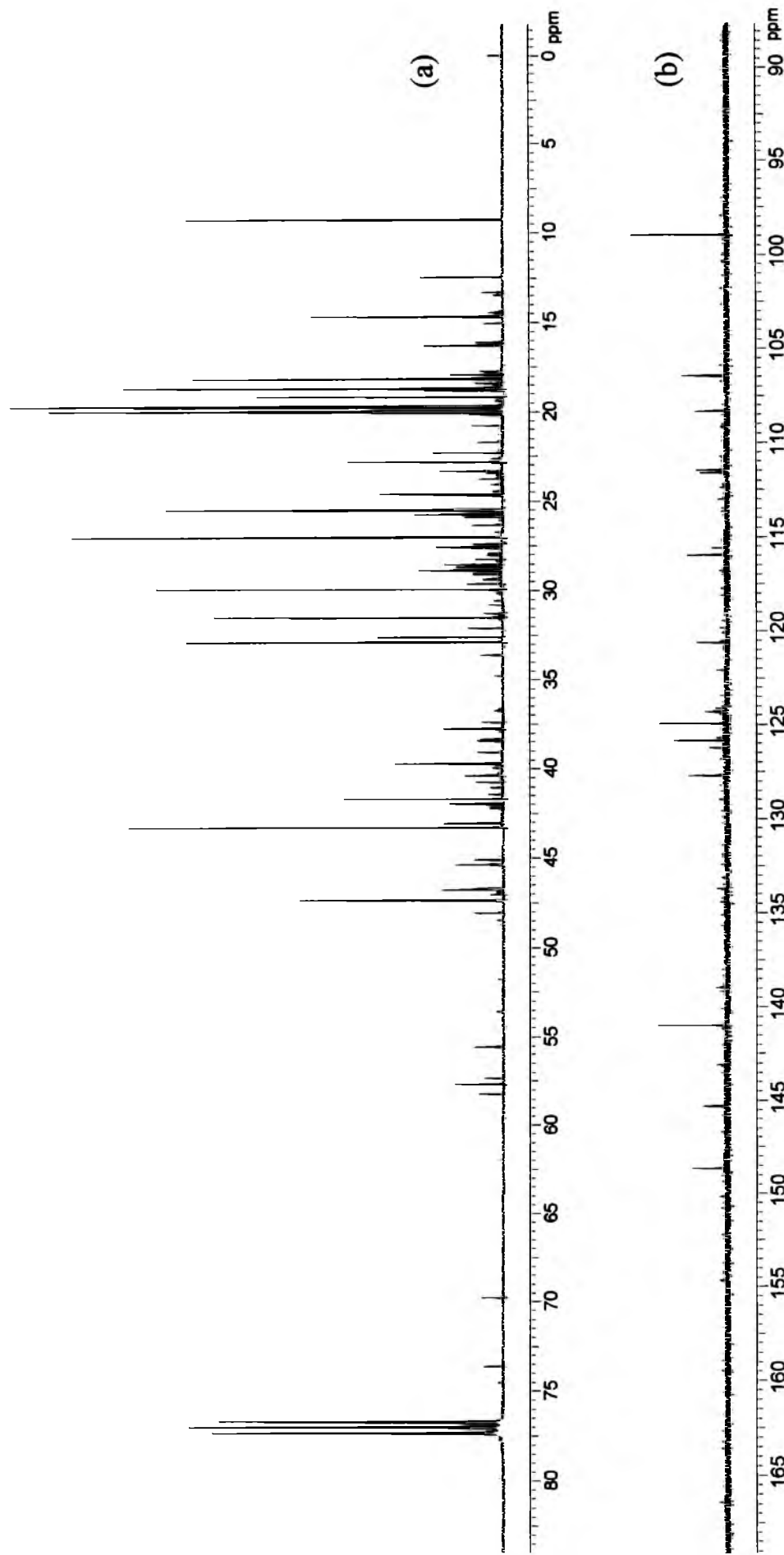
(b)

Rys. 63. Chromatogramy gazowe olejków eterycznych *Salvia triloba* pochodzących z dwóch różnych sezonów wegetacyjnych (a) 2007 i (b) 2008 roku [106]. Numery na chromatogramach odpowiadają zidentyfikowanym związkom lotnym, przedstawionym w Tab. 8. (HS-GC/MS; temperatura i czas desorpcji HS: odpowiednio 70°C i 15 min, kolumna kapilarna DB-5 (30 m × 0,25 mm, grubość filmu 0,25 μm, analiza gradientowa)

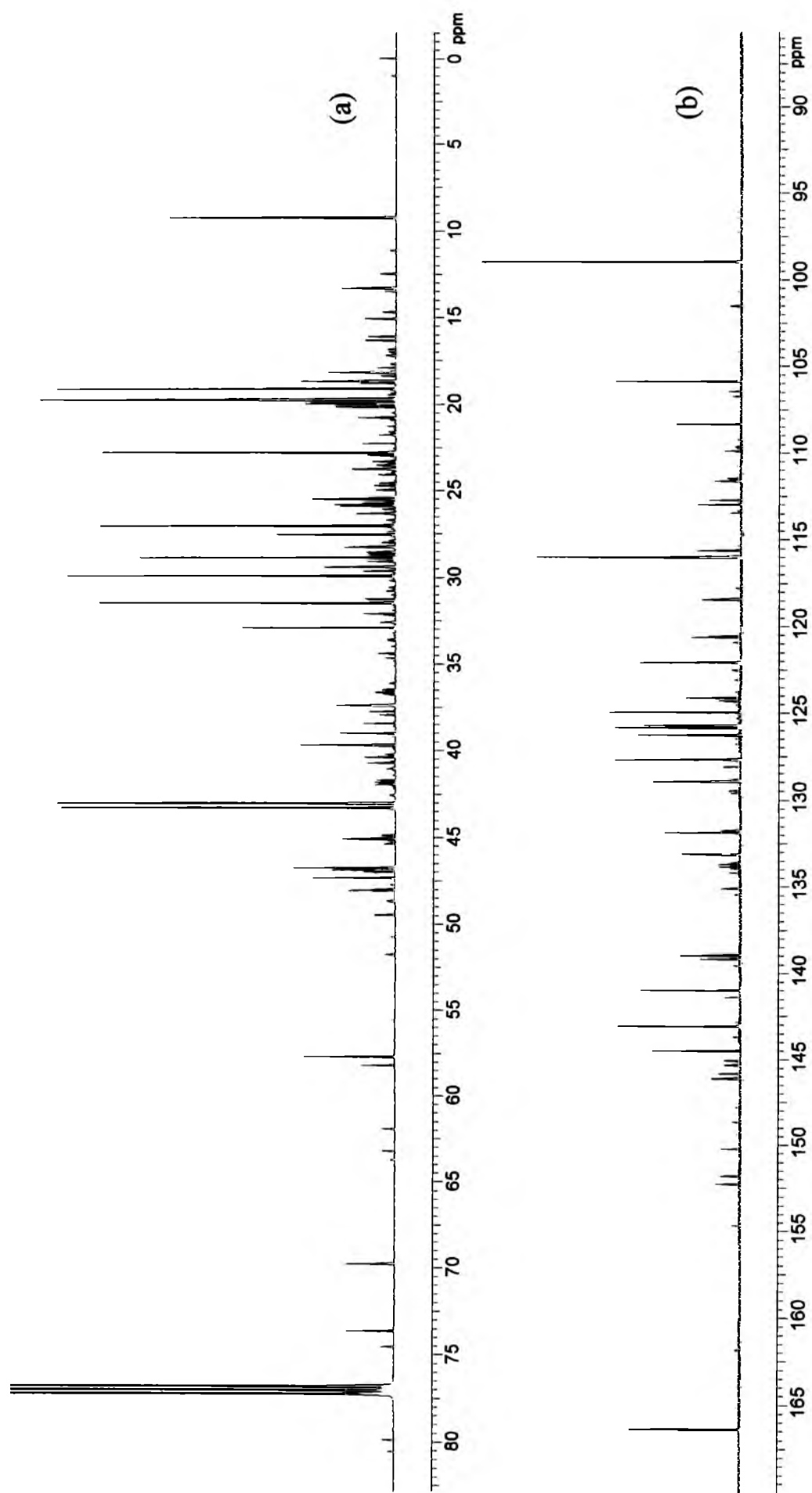
Na podstawie wzrokowej oceny przedstawionych wyników można stwierdzić jakościowe podobieństwo lotnej frakcji poszczególnych gatunków, niezależnie od sezonu wegetacyjnego, z którego pochodziły próbki. Jakościowe różnice pomiędzy chromatograficznymi „fingerprintami” olejków eterycznych różnych gatunków szalwii są także na przedstawionych chromatogramach wyraźnie widoczne.

Na rys. 64 przedstawiono widma zarejestrowane techniką spektroskopii  $^{13}\text{C}$  NMR przy częstotliwości pola magnetycznego 100 MHz dla olejku eterycznego *Salvia triloba*.

Widmo olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia* pokazane na rys. 65 zostało zarejestrowane przy częstotliwości 150 MHz z zastosowaniem 40 tysięcy skanowań, aby uzyskać potrzebną dla celów interpretacyjnych rozdzielczość oraz intensywność poszczególnych sygnałów.



Rys. 64. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR zarejestrowane przy częstotliwości 100 MHz dla olejku eterycznego *Salvia triloba*, rozpuszczonego w  $\text{CDCl}_3$ ; (a) obszar alifatyczny, (b) obszar olefinowy i aromatyczny widma

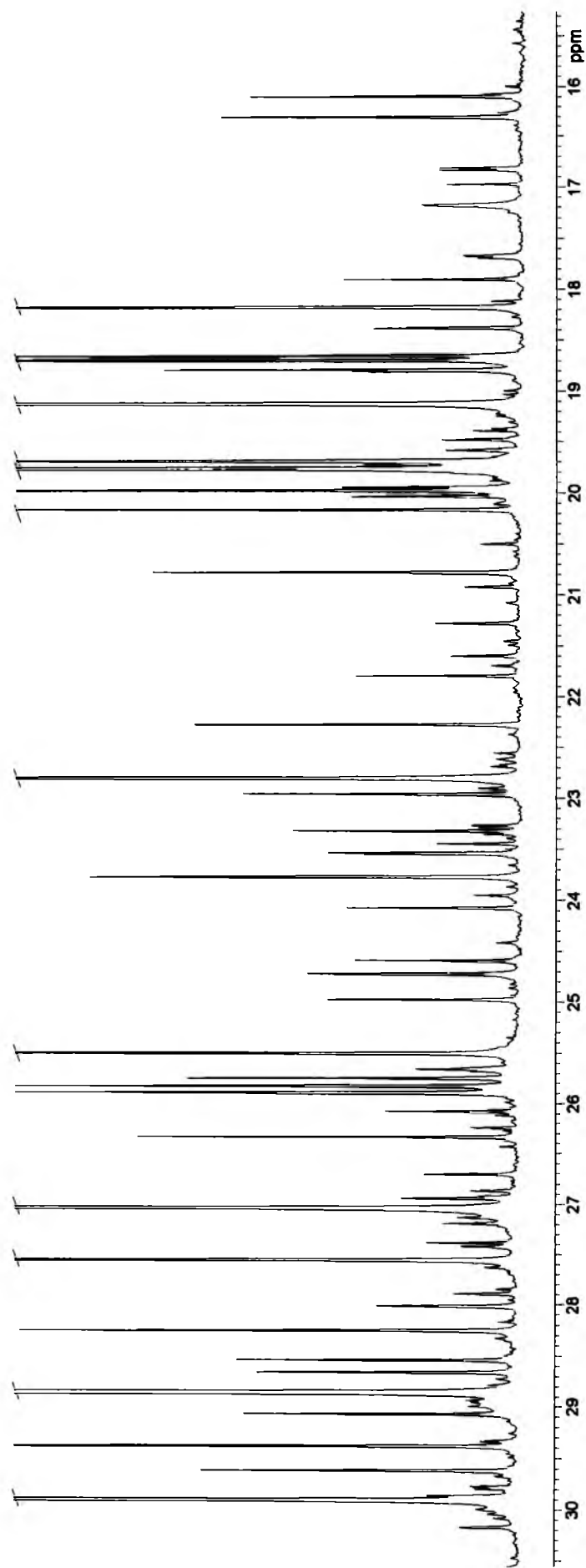


Rys. 65. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR zarejestrowane przy częstotliwości 150 MHz dla olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia* rozpuszczonego w  $\text{CDCl}_3$ ; (a) obszar alifatyczny, (b) obszar olefinowy i aromatyczny widma

Główny obszar widma  $^{13}\text{C}$  NMR, zarejestrowanego dla *Salvia triloba*, zawierający związki o charakterze alifatycznym (rys. 64a) występuje między 8 a 48 ppm oraz od 55 do 58,5 ppm. Kilka wyraźnych sygnałów występuje w przedziale od 99 do 127 ppm (rys. 64b) oraz między 140 a 150 ppm. Ta część widma jest typowa dla aromatycznych atomów węgla, jednak w omawianym obszarze również występują linie spektralne pochodzące od olefinowych i czwartorzędowych atomów węgla.

W obszarze alifatyczny widma  $^{13}\text{C}$  NMR, zarejestrowanego dla *S. lavandulifolia* L. (rys. 65a), jak również w obszarze olefinowym oraz zawierającym czwartorzędowe atomy węgla (rys. 65b) znajdujemy równomiernie rozmieszczone sygnały o niskiej intensywności wskazujące na obecność wielu związków w szerokim zakresie stężeń.

Powiększony obraz obszaru alifatycznego próbki *Salvia lavandulifolia*, zarejestrowanego przy częstotliwości 150 MHz (rys. 66) charakteryzuje się doskonałą rozdzielczością linii spektralnych, co może okazać się pomocne przy ustalaniu struktury poszczególnych składników mieszaniny.



Rys. 66. Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR zarejestrowane przy częstotliwości 150 MHz dla olejku eterycznego *Salvia lavandulifolia* rozpuszczonego w  $\text{CDCl}_3$ . Powiększenie obszaru alifatycznego zawierającego się w przedziale od 15 do 30 ppm

Widmo  $^{13}\text{C}$  NMR zarejestrowane dla *Salvia lavandulifolia* przy częstotliwości 150 MHz posiada wiele cech jakościowych porównywalnych z tymi, które zostały zarejestrowane przy 100 MHz dla *Salvia triloba*. Różnice dotyczą głównie tych komponentów, które występują w mniejszym stężeniu. Oczywistym jest, że zwiększenie częstotliwości pola magnetycznego ze 100 do 150 MHz oraz zwiększenie liczby skanowań ma duże znaczenie w analizie tych składników olejków eterycznych, które nie dominują w próbce, a jednak ich obecność jest bardzo istotna.

W przypadku zastosowania stosunkowo niskiego stężenia mieszaniny oraz przy użyciu w analizie NMR niepolarnego rozpuszczalnika w celu uniknięcia interakcji molekularnych, przesunięcia chemiczne, charakterystyczne dla czystych komponentów są wystarczająco stabilne i powtarzalne, aby je wykorzystać do wskazania konkretnych linii spektralnych pochodzących od danej grupy związków. Tego typu analizy udało się przeprowadzić dla mieszaniny węglowodorów [142] oraz, jak to wykazał Casanova i in. [143], takie podejście jest możliwe również wówczas, gdy przedmiotem badań są olejki eteryczne.

W związku z tym niezbędne jest skompletowanie biblioteki widm pojedynczych związków i porównywanie przesunięć chemicznych oraz względnych intensywności ustalonych dla czystych związków z odpowiednimi liniami spektralnymi komponentów obecnych w mieszaninie. Niestety, ze względu na złożoność próbek pochodzenia naturalnego oraz na ograniczony dostęp do substancji wzorcowych, badania takie są niezwykle trudne. Niniejsza analiza miała na celu jedynie potwierdzenie charakteru chemicznego związków znajdujących się w olejkach eterycznych dwóch różnych gatunków szalwii przy pomocy spektroskopii  $^{13}\text{C}$  NMR [144].

## 9. Chemometryczna analiza chromatogramów gazowych frakcji lotnej dla różnych gatunków szalwii (*Salvia sp.*) traktowanych jako „odciski palca”

Obecnie użycie „odcisków palca” (z ang. *fingerprints*) jest bardzo popularne na przykład w kontroli jakości leków pochodzenia naturalnego [145], w przemyśle naftowym [146], w biotechnologii przy mapowaniu peptydów [147, 148], czy przy badaniu pochodzenia niektórych produktów [149]. Chromatogramy (traktowane jako „fingerprinty”) bardzo złożonych mieszanin, do jakich należą m.in. próbki pochodzenia naturalnego, są często używane w analizie chemicznej ze względu na wysokie koszty lub wręcz brak dostępu do substancji wzorcowych.

Analizy porównawcze próbek reprezentowanych przez ich chromatograficzne „fingerprinty” mogą być ułatwione przez zastosowanie metod chemometrycznych. Różnorodność narzędzi chemometrycznych pozwala na przetwarzanie danych chromatograficznych [150], ocenę różnic między próbkami [151], oszacowanie liczby składników mieszaniny [152, 153], czy wizualizację danych wielowymiarowych [154]. W większości przypadków, chromatograficzne „fingerprinty” wymagają pewnego przygotowania przed dalszą analizą chemometryczną. Przygotowywanie i przetwarzanie chromatograficznych „fingerprintów” jest trudne i należy szczególnie uważać wówczas, gdy kolejno stosowanych jest kilka metod. Uzyskane „odciski palca” mogą zawierać różne informacje w zależności od rodzaju próbki oraz od wybranej techniki analizy i dlatego zastosowane metody chemometryczne powinny podkreślać różnice w składzie chemicznym między analizowanymi próbkami, natomiast niwelować niepożądane odchylenia instrumentalne, a także zwiększać stosunek sygnału do szumu pojedynczych sygnałów.

W opisywanym eksperymencie skoncentrowano się na kilku aspektach analizy chemometrycznej „fingerprintów” w formie chromatogramów gazowych frakcji lotnej, uzyskanych techniką HS-GC/MS dla dwudziestu gatunków szalwii (*Salvia sp.*) (Tab. 14).



Tab. 14. Zestawienie gatunków szalwii będących obiektem analizy chemometrycznej

<b>Fingerprint nr</b>	<b>Gatunek szalwii (<i>Salvia</i> L.)</b>
1	<i>S. azurea</i>
2	<i>S. lavandulifolia</i>
3	<i>S. verticillata</i>
4	<i>S. pratensis</i>
5	<i>S. staminea</i>
6	<i>S. deserta</i>
7	<i>S. cadmica</i>
8	<i>S. forskaohlei</i>
9	<i>S. sclarea</i>
10	<i>S. canariensis</i>
11	<i>S. hians</i>
12	<i>S. triloba</i>
13	<i>S. glutinosa</i>
14	<i>S. nemorosa</i>
15	<i>S. tesquicola</i>
16	<i>S. amplexicaulis</i>
17	<i>S. atropatana</i>
18	<i>S. stepposa</i>
19	<i>S. jurisicii</i>
20	<i>S. officinalis</i>

Analiza porównawcza została przeprowadzona dla zestawu „fingerprintów” uzyskanych techniką chromatografii gazowej z detekcją masową i dozownikiem próbek typu *headspace* (HS-GC/MS). W zależności od jakości „fingerprintów”, mogą one wymagać różnych przekształceń, m.in. korekty linii bazowej, odsumiania, czy dopasowania sygnałów.

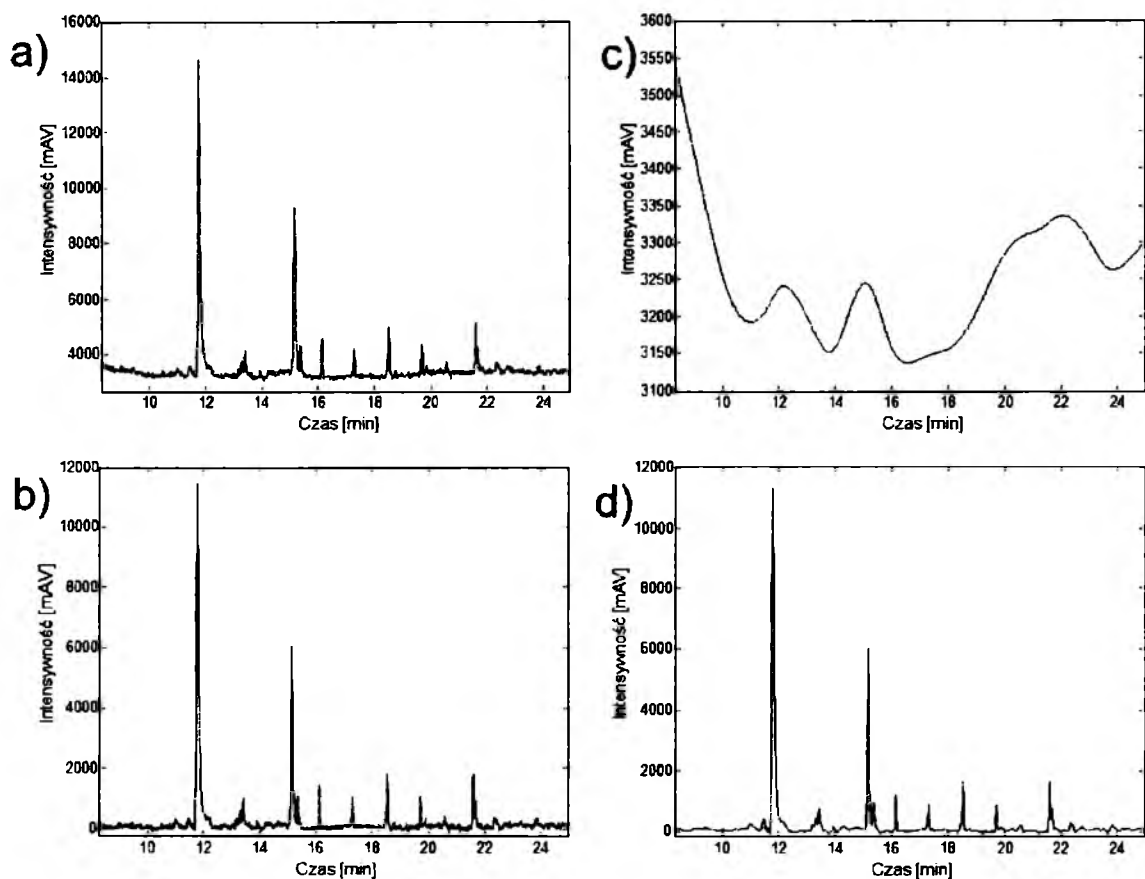
Chemometria dysponuje metodami, które można wykorzystywać do analizy i oceny różnic między chromatograficznymi „fingerprintami”. Wstępne przygotowanie sygnałów instrumentalnych do ich dalszej analizy porównawczej ma zasadnicze

znaczenie niezależnie od rodzaju zastosowanej metody i jest zazwyczaj przeprowadzane w celu polepszenia jakości sygnału oraz zwiększenia interpretacji wyników końcowych. Cele te realizowane są zazwyczaj w kilku etapach.

W niniejszych badaniach pierwszym krokiem przy przygotowaniu sygnałów instrumentalnych było dostosowanie ich długości i/lub usunięcie pewnych ich części, które nie wnoszą istotnych informacji do interpretacji wyników. Dlatego dla wszystkich „odcisków palca” uzyskanych techniką chromatografii gazowej sprzężonej z detekcją masową (GC/MS) został usunięty obszar między 0 a 8,5 min, gdyż wszystkie interesujące nas lotne związki organiczne opuszczały kolumnę co najmniej po 10 minutach od wprowadzenia próbki do kolumny chromatograficznej.

Kolejnym etapem było dokonanie wzmocnienia stosunku sygnału do szumu dla chromatograficznych „odcisków palca”. Aby usunąć tło sygnałów, zastosowano metodę PALS, natomiast do wyeliminowania szumu użyto transformacji falkowej. Optymalna wartość „parametru kary”,  $\lambda$ , w metodzie PALS była równa  $10^5$  dla wszystkich analizowanych „fingerprintów” oprócz pochodzącego od *Salvia canariensis* (nr 10 Tab. 14), dla którego jego wartość wynosiła  $10^3$ . Na rysunku 67a przykładowo pokazano usuwanie tła metodą PALS dla „odcisku palca” *Salvia cadmica* (nr 7, Tab. 14).

Można zauważyć, że analizowany „odcisk palca” wymaga przesunięcia i korekcji tła, ponieważ te dwie operacje w znaczący sposób przyczyniają się do polepszenia jakości sygnału. Na rys. 67b pokazano ten sam „odcisk palca” po usunięciu tła, natomiast na rys. 67c zamieszczono profil usuniętego tła przy pomocy metody PALS.



Rys. 67 a) Chromatogram HS-GC/MS frakcji lotnej dla *Salvia cadmica*, b) chromatogram po usunięciu tła metodą PALS, c) aproksymowana linia bazowa metodą PALS, oraz d) chromatogram po eliminacji tła metodą PALS i po usunięciu szumu z wykorzystaniem transformacji falkowej

Eliminacja tła była konieczna dla wszystkich rozpatrywanych „odcisków palca”, uzyskanych techniką HS-GC/MS. Zbiór sygnałów instrumentalnych wymagał również usunięcia szumu. W tym celu zastosowano transformację falkową przeprowadzoną przy pomocy oprogramowania [155]. Użyto dwóch poziomów dekompozycji, a do eliminacji nieistotnych detali posłużono się kryterium „Visu”. Na rys. 67d przedstawiono „fingerprint” *Salvia cadmica* po eliminacji szumu przy użyciu transformacji falkowej.

Kolejnym etapem było dopasowanie i nałożenie „odcisków palca” metodą COW przy pomocy oprogramowania [156]. Na wstępie dokonano wyboru sygnału wzorcowego na podstawie współczynników korelacji i do niego dopasowano pozostałe sygnały instrumentalne. Dla wszystkich „odcisków palca” optymalne wyniki uzyskano wówczas, gdy sygnały zostały podzielone na 90 sekcji i liczba „parametrów swobody” (ang. *slack parameters*) wynosiła 5. Metoda COW pozwoliła zadowalająco dopasować sygnały, mimo iż próbki ekstraktów roślinnych znacząco różniły się między sobą składem chemicznym.

Końcowym etapem przygotowania chromatograficznych „odcisków palca” była ich normalizacja. Jedną z najczęściej stosowanych do tego celu transformacji jest prosta normalizacja sygnału, która umożliwia usunięcie błędów związanych z czynnością zadawania próbki. Istnieją również inne warianty normalizacji, np. skalowania profili stężeniowych sygnału do największego pików, skalowanie *Pareto*, itp. [157, 158]. Następnie „odciski palca” były centrowane przed dalszą analizą porównawczą. Kompleksowy przegląd różnych metod przygotowania sygnałów instrumentalnych do analizy chemometrycznej można znaleźć w pracach [157, 159].

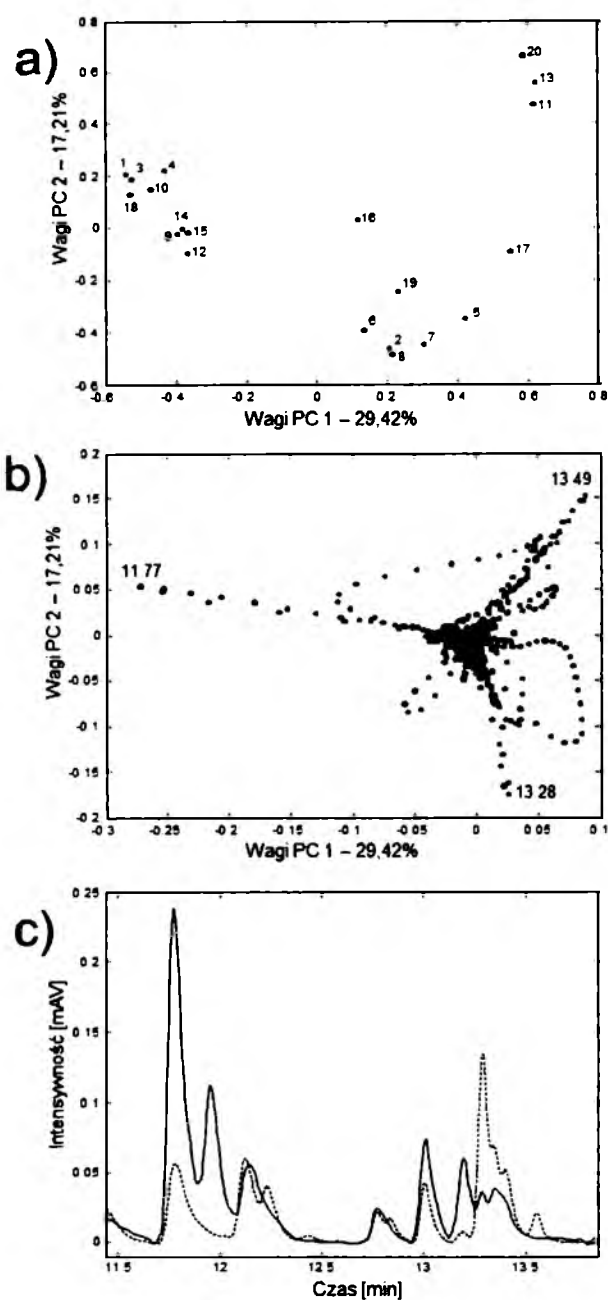
Dopiero po odpowiednim przygotowaniu chromatograficznych „fingerprintów” (czyli po usunięciu z chromatogramów tych obszarów, które nie wnoszą żadnych informacji do interpretacji wyników, po eliminacji tła i szumu, oraz po dostosowaniu „odcisków palca” i ich normalizacji) możliwa jest analiza porównawcza badanych próbek. Jeżeli czynności związane z przygotowaniem sygnałów do dalszej analizy zostały przeprowadzone poprawnie, to usunięte z nich zostały wszystkie niepożądane elementy. Właściwa analiza porównawcza powinna uwzględniać jedynie informację dotyczącą zróżnicowania chemicznego próbek.

W omawianym przypadku „fingerprinty” reprezentują skład chemiczny lotnych związków organicznych, zawartych w różnych gatunkach szalwii (*Salvia* L. *sp.*). Uzyskane dwa pierwsze czynniki główne opisały około 46,6% całkowitej wariancji danych. Mimo, iż kompresja danych nie była zbyt skuteczna, projekcje wyników

przedstawione na rys. 68a i b wskazują na niejednorodną strukturę danych. Możliwe jest wyróżnienie trzech grup próbek. Pierwsza grupa składała się z dziewięciu próbek (nr 1, 3, 4, 9, 10, 12, 14, 15 i 18), druga zawierała osiem próbek (nr 2, 5, 6, 7, 8, 16, 17 i 19), a trzecia próbki nr 11, 13 i 20. Numerację próbek wraz z odpowiadającymi im gatunkami szalwii zestawiono w Tab. 14. Następnie przeprowadzono analizę porównawczą składu chemicznego w przestrzeni czynników głównych i wywnioskowano, że największy wkład w konstrukcję pierwszego czynnika głównego (PC1) wnoszą profile stężeniowe o czasie retencji ok. 11,77 min, a piki od 13,28 do 13,49 min wnoszą znaczący wkład do drugiego czynnika głównego (PC2). W innym eksperymencie przeprowadzonym w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano, że piki te pochodzą od kamfenu, limonenu i eukaliptolu [107].

Próbki z pierwszej grupy posiadają stosunkowo wysoki sygnał przy czasie retencji ok. 11,77 min, w porównaniu z innymi należącymi do pozostałych grup, a zatem próbki te są stosunkowo bogate w kamfen. Próbki z drugiej grupy charakteryzują się średnią zawartością kamfenu i bardzo małą zawartością limonenu i eukaliptolu. Unikalne własności próbek z trzeciej grupy można wyjaśnić wartościami wag drugiego czynnika głównego (PC2). Dla tych próbek profile stężeniowe przy czasie retencji 13,49 min (wysokiej intensywności) oraz przy czasach retencji ok. 11,77 min i 13,28 min (niskiej intensywności) odgrywają istotną rolę. Próbki te zawierają stosunkowo niewielką ilość kamfenu i limonenu, natomiast charakteryzują się znaczną zawartością eukaliptolu.

Na rysunku. 68c przedstawiono dwa nałożone na siebie chromatogramy *Salvia cadmica* i *Salvia nemorosa* (nr 7 i 14), dla których różnice w składzie chemicznym zostały opisane przy pomocy analizy czynników głównych (PCA). Różnice między dwoma wspomnianymi wyżej gatunkami szalwii są głównie ilościowe.



Rys. 68 a) Projekcja dwudziestu gatunków szalwii na płaszczyznę zdefiniowaną przez pierwszy i drugi czynnik główny PC1 – PC2, b) projekcja wag dwóch pierwszych czynników głównych, oraz c) dwa nałożone na siebie chromatogramy: *Salvia cadmica* (linia przerywana) i *Salvia nemorosa* (linia ciągła), dla których przy pomocy PCA opisano różnice w składzie chemicznym

Przeprowadzona analiza chemometryczna pozwala na wysunięcie następujących wniosków:

- Wstępne przygotowanie chromatograficznych „odcisków palca” jest bardzo ważnym elementem analizy porównawczej przy użyciu technik chemometrycznych;
- We wstępnym dostosowywaniu sygnałów instrumentalnych do analizy chemometrycznej należy starannie wybrać kolejność metod, jakie będą używane w celu polepszenia jakości sygnału;
- Analiza czynników głównych (PCA) umożliwia wskazanie różnic między próbkami i uzyskanie informacji na temat wkładu oryginalnych zmiennych do całkowitej wariancji danych. W przypadku sygnałów chromatograficznych można wskazać kilka istotnych miejsc na chromatogramie, które są charakterystyczne i zawierają ważne informacje dla wyjaśnienia struktury danych.

Przy pomocy PCA możliwe jest wytypowanie pewnych próbek, które mogą pomagać w identyfikacji poszczególnych związków obecnych we frakcji lotnej dwudziestu gatunków szatwii (*Salvia* L.). Metoda PCA pozwoliła również zauważyć ważne obszary na chromatogramach, wyjaśniające różnice między próbkami, które w rozpatrywanym przypadku oparte są głównie na zawartości kamfenu, limonenu i eukaliptolu.

## 10. Podsumowanie

Całość przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badań z zakresu analizy składu chemicznego roślin (tj. z zakresu analizy fitochemicznej) pozwala na sformułowanie następującego podsumowania:

- Przeprowadzone badania posiadają charakter zarówno poznawczy, jak i metodyczny.
- Charakter badawczy posiada ta część badań, która została wykonana dla dwudziestu różnych gatunków szalwii przy zastosowaniu klasycznej techniki analitycznej, tradycyjnie służącej do analizy frakcji lotnej metabolitów wtórnych w materiale botanicznym. Technika tą jest kapilarna chromatografia gazowa z detekcją masową (GC/MS).
- Na podstawie uzyskanych techniką GC/MS wyników udało się m.in. zaproponować dla niektórych gatunków szalwii lotne metabolity wtórne, mogące spełniać rolę odpowiednich markerów lub wskaźników chemotaksonomicznych, co w odniesieniu do rodzaju szalwii stanowi istotną nowość naukową.
- Nowość naukową w odniesieniu do wyników analitycznych dotyczących rodzaju szalwii stanowiła również ich ocena chemometryczna z zastosowaniem analizy czynników głównych (PCA) oraz wskazanie tych grup roślin, które wykazują największe wzajemne podobieństwo pod względem składu jakościowego oraz ilościowego frakcji lotnej metabolitów wtórnych. Taki sposób opracowania wyników może okazać się szczególnie przydatny m.in. w przypadku poszukiwania nowych kandydatów spełniających określone wymogi farmakopealne, alternatywnych względem roślin o już uznanym potencjale leczniczym.
- Charakter metodyczny przeprowadzonych badań posiadało porównanie czterech różnych sposobów ekstrakcji frakcji lotnej z badanych gatunków szalwii dla potrzeb ich dalszej analizy techniką GC/MS. Desorpcja z fazy nadpowierzchniowej w temperaturze 70°C okazała się najskuteczniejszą metodą wyodrębnienia tej frakcji z materiału roślinnego.



- Charakter metodycznej nowości naukowej w prezentowanej pracy stanowiło skuteczne pozyskiwanie densytometrycznych „odcisków palca” dla frakcji lotnej metabolitów wtórnych wybranych gatunków szalwii (otrzymanych na drodze destylacji z parą wodną) techniką analitycznej niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej (*low-temperature thin layer chromatography*, LT TLC) z detekcją densytometryczną. Charakter metodycznej nowości naukowej stanowiło zaproponowanie dwóch nowych układów służących do analizy frakcji lotnej roślinnych metabolitów wtórnych, mianowicie (i) jednowymiarowego układu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej poprzez interfejs TLC-MS z detektorem mas (1D LT TLC-MS) oraz (ii) dwuwymiarowego układu niskotemperaturowej chromatografii cienkowarstwowej sprzężonej poprzez interfejs TLC-MS z wysokosprawną chromatografią cieczą oraz z detektorem mas (2D LT TLC-LC-MS). Wyrażono przypuszczenie, iż nowo opracowane układy 1D TLC-MS oraz 2D TLC-LC-MS mogą w przyszłości okazać się bardzo skutecznymi narzędziami analitycznymi, służącymi do konstruowania wielowymiarowych „odcisków palca” złożonych mieszanin pochodzenia naturalnego, jednakże będą one wymagały istotnego wsparcia chemometrycznego przy porównywaniu uzyskiwanych wyników w postaci zróżnicowanych (pod względem zastosowanych technik analitycznych) sygnałów instrumentalnych. Charakter metodycznej nowości naukowej w odniesieniu do frakcji lotnej metabolitów wtórnych pochodzących z rodzaju szalwii stanowiło przeprowadzenie wstępnych prób analizy wzmiankowanej frakcji techniką spektroskopii  $^{13}\text{C}$  NMR dla dwóch wybranych gatunków szalwii. Uzyskano wyniki, które wskazują na stosunkową łatwość, a zatem również na uzasadnioną celowość prowadzenia analiz identyfikacyjnych tą właśnie techniką, pod warunkiem dostępności (bądź uprzedniego sporządzenia) odpowiedniej biblioteki widm  $^{13}\text{C}$  NMR dla terpenów i terpenoidów.

## LISTA PRAC WŁASNYCH TEMATYCZNIE ZWIĄZANYCH Z ROZPRAWĄ DOKTORSKĄ

1. "Fingerprint of selected *Salvia* species by HS-GC/MS analysis of their volatile fraction",  
J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, G. Grygierczyk, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. Chromatogr. Sci., **47**, 575-580 (2009)
2. "A GC-MS study of the performance of different volatile fraction isolating techniques and a comparison of seasonal differences in composition thereof with the sage (*Salvia* L.) species",  
M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos. Acta Chromatogr., **21**, 453-471 (2009)
3. "Comparative analysis of the chromatographic fingerprints of twenty different sage (*Salvia* L.) species",  
M. Daszykowski, M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, D. Staszek, **Ł. Wojtal**, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak, Acta Chromatogr., **21**, 513-530 (2009)
4. "Low temperature planar chromatography-densitometry and gas chromatography of essential oils from different sage (*Salvia*) species",  
M. Sajewicz, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., **33**, 936-947 (2010)
5. "Low-temperature TLC-MS of essential oils from five different sage (*Salvia*) species"  
M. Sajewicz, **Ł. Wojtal**, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. Planar Chromatogr., **23**, 270-276 (2010)
6. "Exploration of a possibility of a combined HS-GC-MS and <sup>13</sup>C NMR spectroscopic investigation of the essential oils composition with the selected sage (*Salvia*) species",  
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, Acta Chromatogr., **23**, 181-190 (2011)
7. "TLC-MS versus TLC-LC-MS fingerprints of herbal extracts. Part I. Essential Oils"  
M. Sajewicz, **Ł. Wojtal**, M. Natić, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 2011 – praca przyjęta do druku

**LISTA PUBLIKACJI KONFERENCYJNYCH TEMATYCZNIE ZWIĄZANYCH Z ROZPRAWĄ  
DOKTORSKĄ**

1. "Separation and identification of the volatile organic compounds in the different species of sage by means of HS-GC/MS"  
J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, K. Labe, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
*"Aktualne problemy chemii analitycznej" Katowice, 30.05.2008*
2. "Separation and identification of the volatile organic compounds in the different species of sage by means of HS-GC/MS"  
J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, K. Labe, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
*6<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products. Lublin, 15-18.06.2008*
3. "A comparison of the efficiency of retrieving volatile constituents from the different sage species (*Salvia* L. species)"  
M. Sajewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos,  
*XXXII Scientific Symposium "Chromatographic methods of investigating organic compounds", Katowice-Szczyrk, 3-5.06.2009*
4. "Chemometrics in comparative analysis of chromatographic fingerprints of the extracts from different sage (*Salvia* L.) species"  
M. Daszykowski, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, M. Hajnos, M. Sajewicz, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak,  
*XXXII Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych”, Katowice-Szczyrk, 3-5.06.2009*
5. "Chemotaxonomic Analysis of the Essential Oil Composition with Two Different Essential-Oil Rich Sage Species (*Salvia lavandulifolia* and *Salvia triloba*) Using Different Sample Preparation Methods"

- M. Sajewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos,  
*8<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods, Siófok (Węgry), 2-4.09.2009*
6. "Utilization of different procedures of retrieving volatile compounds contained in a variety of the sage species (*Salvia species* L.) for the analysis by means of GC-MS"
- M. Sajewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos,  
*II Ogólnopolskie Sympozjum „Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych, Lublin, 24-25.09.2009*
7. "HS-GC-MS comparison of seasonal differences in chemical composition of the volatile fraction derived from the selected sage (*Salvia* L.) species"
- M. Sajewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, D. Staszek, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos,  
*II Ogólnopolskie Sympozjum „Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych, Lublin, 24-25.09.2009*
8. „Chromatographic and spectroscopic analysis of essential oils from *Salvia lavandulifolia* and *Salvia triloba*”
- M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
*XXXIII Sympozjum Naukowe nt. "Chromatograficzne metody badania związków organicznych", Katowice-Szczyrk, 25-27.05.2010*
9. "A comparison of the essential oil fingerprints derived from selected sage (*Salvia*) species with use of thin-layer chromatography directly and indirectly coupled with mass spectrometry"
- M. Sajewicz, **Ł. Wojtal**, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
*XXXIII Sympozjum Naukowe nt. „Chromatograficzne metody badania związków organicznych”, Katowice-Szczyrk, 25-27.05.2010*

10. "The analysis of essential oils from the selected sage (*Salvia* L.) species by means of HS-GC-MS AND  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy"  
M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, J. Rzepa, **Ł. Wojtal**, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska  
*7<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin, 14-17.06.2010*
11. "A comparison of the essential oil fingerprints derived from selected sage (*Salvia* L.) species with use of TLC-MS and TLC-LC-MS systems"  
M. Sajewicz, **Ł. Wojtal**, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
*7<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography of Natural Products, Lublin, 14-17.06.2010*
12. "A comparison of traditional and alternative fingerprinting methods with essential oils derived from plant material"  
M. Sajewicz, **Ł. Wojtal**, M. Natić, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska,  
*V Congress of Pharmacists of Serbia, Belgrad (Serbia), 13-17.10.2010*

## **ŻYCIORYS**

Imię i nazwisko: Łukasz Wojtal  
Data i miejsce urodzenia: 11.06.1983, Katowice  
Stan cywilny: kawaler  
Adres zamieszkania: ul. Kochłowska 13/28, 41-506 Chorzów

### **Wykształcenie:**

Od 2007: słuchacz Studium Doktoranckiego przy Instytucie Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach  
2002-2007 Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Mat-Fiz-Chem., kierunek: chemia  
Specjalność: Fizykochemiczne metody w ocenie środowiska  
1997–2001 III Liceum Ogólnokształcące im. Stefana Batorego w Chorzowie

### **Doświadczenie zawodowe:**

01.10.2007 Rozpoczęcie studiów doktoranckich stacjonarnych na kierunku Chemia, Uniwersytet Śląski w Katowicach  
01.10.2008 – 30.09.2011 Stypendium doktoranckie w ramach projektu „Uniwersytet Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy” (UPGOW) współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (EFS)  
01.10.2007 – 30.06.2010 Umowa o pracę z Uniwersytetem Śląskim na stanowisku asystenta naukowo-dydaktycznego w Zakładzie Chemii Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii

## LITERATURA:

---

- [1] A. Ożarowski, W. Jaroniewski, „Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie”, Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa, 1989
- [2] E. Lamer – Zarawska, B. Kowal-Gierczak, J. Niedworok, „Fitoterapia i leki roślinne”, PZWL, Warszawa, 2007
- [3] E. Kuźniewski, J. Augustyn- Puziewicz, „Przewodnik ziołolecznictwa ludowego”, PWN, Warszawa, 1984
- [4] D. Tuszyńska – Kownacka, „Zioła w domu”, Wydawnictwo Współczesne, Warszawa, 1988
- [5] W. S. Brud, „Aromaterapia. Leksykon roślin leczniczych”, MedPharm, Wrocław, 2009
- [6] B. Broda, J. Mowszowicz, „Przewodnik do oznaczania roślin leczniczych, trujących i użytkowych”, PZWL, Warszawa, 2000
- [7] A. Sarwa, „Wielki leksykon roślin leczniczych”, Książka i Wiedza, Warszawa, 2001
- [8] B.E. van Wyk, M. Wink, „Rośliny lecznicze świata”, MedPharm, Wrocław, 2008
- [9] A. Rausch, B. Lotz, „Zioła – Leksykon”, Wydawnictwo Książkowe Elipsa, Warszawa, 2006
- [10] B. Pawłowski, „Flora polska, rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych”, PWN, Warszawa- Kraków, 1963
- [11] E.M. Senderski, „Prawie wszystko o ziołach”, Podkowa Leśna, 2007
- [12] L. Świejkowski, „Rośliny lecznicze i przemysłowe”, Wydawnictwo Rynku Wewnętrznego „Libra”, Warszawa, 1990
- [13] L. Samochowiec, „Kompendium ziołolecznictwa”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2002
- [14] S. Kohlmünzer, „Farmakognozja”, PZWL, Warszawa, 2007
- [15] <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/s/sages-05-l.jpg>
- [16] [http://www.mytho-fleurs.com/images/jardins\\_botaniques/Gand-2/salvia%20lavandulifolia%202.JPG](http://www.mytho-fleurs.com/images/jardins_botaniques/Gand-2/salvia%20lavandulifolia%202.JPG)
- [17] [http://www.about-garden.com/images\\_data/3662-salvia-sclarea-salvej-muskatova-2.jpg](http://www.about-garden.com/images_data/3662-salvia-sclarea-salvej-muskatova-2.jpg)
- [18] Y. Takeda, H. Zhang, T. Matsumoto, *Phytochem.*, **44**, 117- 120 (1997)
- [19] [http://www.swiatkwiatow.pl/foto/szalwia-omszona-salvia-nemorosa\\_2762.jpg](http://www.swiatkwiatow.pl/foto/szalwia-omszona-salvia-nemorosa_2762.jpg)

- 
- [20] <http://www.biopix.dk/Photo.asp?Language=la&PhotoId=55854&Photo=Salvia-triloba>
- [21] [http://www.swiatkwiatow.pl/foto/szalwia-lakowa-salvia-pratensis\\_2741.jpg](http://www.swiatkwiatow.pl/foto/szalwia-lakowa-salvia-pratensis_2741.jpg)
- [22] C.J. Steveson, Clin. Dermatol., **16**, 689-694 (1998)
- [23] D. Tiran, Complement. Ther. Nurs. Mid., **2**, 88-92 (1996)
- [24] „Farmakopea Polska VII”, Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne, Warszawa, 2006
- [25] A. Kołodziejczyk, „Naturalne związki organiczne”, PWN, Warszawa, 2003
- [26] J. Mc Murry, „Chemia organiczna” cz. II, PWN, Warszawa, 2000
- [27] A. Pauli, Int. J. Aromather., **11**, 126-133 (2001)
- [28] K.A. Youdim, S.G. Deans, H.J. Finlayson, J. Essent. Oil Res., **14**, 210-215 (2002)
- [29] H.J.D. Dorman, S.G. Deans, J. Appl. Microbiol., **88**, 308-316 (2000)
- [30] M. Lis – Balachin, J.R. Ochocka, S. Deans, M. Asztemborska, S. Hart, Med. Sci. Res., **24**, 309-310 (1996)
- [31] J.D. Haag, M.J. Lindstrom, M.N. Gould, Cancer Res., **52**, 4021-4026 (1992)
- [32] P.L. Crowell, C.E. Elson, H.H. Bailey, A. Elegbede, J.D. Haag, M.N. Gould, Cancer Chemoth. Pharm., **35**, 31-37 (1994)
- [33] S. Kawata, T. Nagase, E. Yamasaki, H. Ishiguro, Y. Matsuzawa, Br. J. Cancer, **69**, 1015-1020 (1994)
- [34] H. Oumzil, S. Ghouli, M. Rhajaoui, A. Ilidrissi, S. Fkih – Tetouani, M. Paid, A. Benjouad, Phytother. Res., **16**, 727-731 (2002)
- [35] M. Lis – Balachin, J.R. Ochocka, S. Deans, M. Asztemborska, S. Hart, J. Essent. Oil Res., **11**, 393-397 (1999)
- [36] J. Kopcewicz, S. Lewak, „Fizjologia roślin”, PWN, Warszawa, 2002
- [37] R.T. Morrison, R.N. Boyd, „Chemia organiczna”, PWN, Warszawa, 1996
- [38] C.A. Stace, „Taksonomia roślin i biosystematyka”, PWN, Warszawa, 1993
- [39] A. Szwejkowska, J. Szwejkowski, „Botanika”, PWN, Warszawa, 1993
- [40] W. Szczepaniak, „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, PWN, Warszawa, 2008
- [41] Z. Witkiewicz, J. Hetper, „Chromatografia gazowa”, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, 2005
- [42] B. Buszewski „Chromatografia i techniki pokrewne w chemii środowiska”, Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń, 1994



- 
- [43] <http://www.biotechnologia.uni.opole.pl/biblioteka/docs/IZOLACJA%20OLEJKOW%20ETERYCZNYCH.pdf>
- [44] [http://www.ztch.umcs.lublin.pl/admin/materialy/cw\\_13\\_ztch.pdf](http://www.ztch.umcs.lublin.pl/admin/materialy/cw_13_ztch.pdf)
- [45] J. Namieśnik, Z. Jamróiewicz, M. Pilarczyk, L. Torres, „Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy”, Wydawnictwo Naukowo- Techniczne, Warszawa, 2000
- [46] [http://www.aga-analytical.com.pl/index.php?page=ASE\\_350](http://www.aga-analytical.com.pl/index.php?page=ASE_350)
- [47] W. Rödel, G. Wölm, „Chromatografia gazowa”, PWN, Warszawa, 1992
- [48] E. de Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant, „Spektrometria mas”, Wydawnictwo Naukowo- Techniczne, Warszawa 1998
- [49] J. Johnstone, M. Rose, „Spektrometria mas”, PWN, Warszawa, 2001
- [50] G. W. Ewing, „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”, PWN, Warszawa, 1980
- [51] „Chemia analityczna – analiza instrumentalna”, praca zbiorowa pod red. R. Kocjana, PZWL, Warszawa, 2002
- [52] H. Luftmann, Anal. Bioanal. Chem., **378**, 964-968 (2004)
- [53] H. Luftmann, M. Aranda, G. Morlock, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 3772-3776 (2007)
- [54] A. Alpmann, G. Morlock, Anal. Bioanal. Chem., **386**, 1543-1551 (2006)
- [55] U. Jautz, G. Morlock, J. Chromatogr. A, **1128**, 244-250 (2006)
- [56] M. Aranda, G. Morlock, J. Chromatogr. A, **1131**, 253-260 (2006)
- [57] G. Morlock, Y. Ueda, J. Chromatogr. A, **1143**, 243-251 (2006)
- [58] U. Jautz, G. Morlock, Anal. Bioanal. Chem., **387**, 1083-1093 (2007)
- [59] M. Aranda, G. Morlock, Rapid Commun. Mass Spectrom., **21**, 1297-1303 (2007)
- [60] M. Aranda, G. Morlock, J. Chromatogr. Sci., **45**, 251-255 (2007)
- [61] G. Morlock, U. Jautz, J. Planar Chromatogr., **21**, 367-371 (2008)
- [62] G. Morlock, E. Dytkiewitz, J. AOAC Int., **91**, 1237-1243 (2008)
- [63] M. Prosek, L. Milivojevic, M. Krizman, M. Fir, J. Planar Chromatogr., **17**, 420-423 (2004)
- [64] A. Orinak, G. Vering, H.F. Arlinghaus, J.T. Andersson, L. Halas, R. Orinakova, J. Planar Chromatogr., **18**, 44-50 (2005)
- [65] G.J. Van Berkel, V. Kertesz, Anal. Chem., **78**, 4938-4944 (2006)
- [66] <http://www.camag.com/v/products/tlc-ms/>

- 
- [67] E. Pinto, L. R. Salgueiro, C. Cavaleiro, A. Palmeira, M. J. Gonçalves. *Ind. Crops Prod.*, **26**, 135-141 (2007)
- [68] Q. Liang, Z. Liang, J.R. Wang, W.H. Xu, *Food Chem.*, **113**, 592-594 (2009)
- [69] A. P. Longaray Delamare, I. T. Moschen- Pistorello, L. Artico, L. Atti- Serafini, S. Echeverrigaray, *Food Chem.*, **100**, 603-608 (2007)
- [70] L. Krstic, D. Malencic , G. Anackov, *Bot. Helv.*, **116**, 159-168 (2006)
- [71] F. Senatore, N. Apostolides Arnold, F. Piozzi, C. Formisano, *J. Chromatogr. A*, **1108**, 276-278 (2006)
- [72] Ł. Kuzma, Z. Skrzypek, H. Wysokinska, *Plant Cell Tiss. Org.*, **84**, 171-179 (2005)
- [73] M. Zeki Haznedaroglu, N. Ulku Karabay, U. Zeybek. *Fitoterapia*, **72**, 829-831 (2001)
- [74] K. Horiuchi, S. Shiota, T. Hatano, T. Yoshida, T. Kuroda, T. Tsuchiya. *Biol Pharm. Bull.*, **30**, 1147-1149 (2007)
- [75] F. Lima, F. Carvalhob, E. Fernandseb, M. L. Bastosob, P. C. Santos-Gomesa, M. Fernandes-Ferreiraa and C. Pereira-Wilson. *Toxicol. in Vitro*, **18**, 457-465 (2004)
- [76] Y. Zhou, G. Xu, F. Fung Kei Choi, L. Ding, Q.Bin Han, J. Zheng Songa, C. Feng Qiao, Q. Zhao, H. Xu, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 4847-4858 (2009)
- [77] D. Baricevic, S. Sosa, R. Della Loggia, A. Turbaso, B. Simonovska, A. Krasna, A. Zupancic, *J. Ethnopharmacol.*, **75**, 125-132 (2001)
- [78] V. I. Deineka, L. A. Deineka, A. M. Ermakov, M. Yu, *Chem. Nat. Compd.*, **40**, 413-416 (2004)
- [79] "Extraction of Oils from Oilseeds by Accelerated Solvent Extraction", Application Note 325, Dionex, Sunnyvale, CA, USA
- [80] M. Daszykowski, B. Walczak, „Chemometria w analityce” (praca zbiorowa pod red. D. Zuby, A. Parczewskiego), Wydawnictwo Instytutu Ekspertyz Sądowych, Kraków, 2008
- [81] P.H.C. Eilers, *Anal. Chem.*, **76**, 404-411 (2004)
- [82] D.F. Thekkudan, S.C. Rutan, rozdz. 2 „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, vol. 2, 2009, str. 9-24
- [83] J. Trygg, J. Gabrielsson, T. Lundstedt, rozdz. 1 „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, vol. 2, 2009, str. 1-8

- 
- [84] B. Walczak, D.L. Massart, *TrAC*, **16**, 451-463 (1997)
- [85] B. Walczak, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **36**, 81-94, (1997)
- [86] B. Walczak, "Wavelets in chemistry", Elsevier, Amsterdam, Holandia, 2000
- [87] S. Mallat, *IEEE T. Pattern Anal.*, **11**, 674-693, (1989)
- [88] S.G. Mallat, *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.*, **11**, 674-693 (1989)
- [89] G. Malmquist, R. Danielsson, *J. Chromatogr. A*, **687**, 71-88 (1994)
- [90] N.-P.V. Nielsen, J.M. Carstensen, J. Smedsgaard, *J. Chromatogr. A*, **805**, 17-35 (1998).
- [91] B. Walczak, W. Wu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **77**, 173-180 (2005)
- [92] A.M. van Nederkassel, M. Daszykowski, P.H.C. Eilers, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1118**, 199-210 (2006)
- [93] J. Forshed, I. Schuppe-Koistinen, S.P. Jacobsson, *Anal. Chim. Acta*, **487**, 189-199 (2003)
- [94] J.H. Jellema, rozdz. 6 „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, vol. 2, 86-108, 2009
- [95] V. Pravdova, B. Walczak, D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, **456**, 77-92 (2002)
- [96] G. Tomasi, F. van den Bergand, C. Andersson, *J. Chemometrics*, **18**, 231-241 (2004)
- [97] S. Wold, K. Esbensen, P. Geladi, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2**, 37-52 (1987)
- [98] P. Gemperline, "Practical guide to chemometrics", Taylor & Francis, Londyn, Wielka Brytania, 2006
- [99] D.L. Massart, Y. Vander Heyden, From tables to visuals: principal component analysis, part 1, *LC-GC Europe*, **17**, 586-591 (2004)
- [100] D.L. Massart, Y. Vander Heyden, From tables to visuals: principal component analysis, part 2, *LC-GC Europe*, **18**, 84-89 (2004)
- [101] W. J. Krzanowski, "Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective", Oxford University Press, Oxford, Wielka Brytania, 2000
- [102] K. Skalicka-Woźniak, J. Widelski, K. Główniak, rozdz. 2 „Thin Layer Chromatography in Phytochemistry” (praca zbiorowa pod red. M. Waksmundzkiej-Hajnos, J. Shermy, T. Kowalskiej), CRC Press, Boca Raton, USA, 2008, str. 15-35
- [103] M. Rajani, N.S. Kanaki, rozdz. 19, „Bioactive Molecules and Medicinal Plants” (praca zbiorowa pod red. K.G. Ramawata i J.M. Mérillona), Springer, Berlin, 2008

- 
- [104] B. Daviss, *The Scientist*, **19**, 25-28 (2005)
- [105] S. G. Oliver, M. K. Winson, D. B. Kell, F. Baganz, *Trends Biotechnol.*, **16**, 373-378 (1998)
- [106] M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, Ł. Wojtal, D. Staszek, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, *Acta Chromatogr.*, **21**, 453-471 (2009)
- [107] J. Rzepa, Ł. Wojtal, D. Staszek, G. Grygierczyk, K. Labe, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 575-580 (2009)
- [108] X.H. Fan, Y.Y. Cheng, Z.L. Ye, R.Ch. Lin, Z.Z. Qian, *Anal. Chim. Acta*, **555**, 217-224 (2006)
- [109] S. Cui, B. Fu, F. Sen-Chun Lee, X. Wang, *J. Chromatogr. B*, **828**, 33-40 (2005)
- [110] S. Battaglia, „*The Complete Guide To Aromatherapy*”. Watson Ferguson & Co., Brisbane, Australia, 1995
- [111] V. Cooksley, „*Aromatherapy: A Lifetime Guide To Healing With Essential Oils*”, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA, 1996
- [112] J. Lawless, „*The Encyclopedia of Essential Oils*”, Element Books Ltd., Londyn, Wielka Brytania, 1992
- [113] J. Lawless, „*The Complete Book of Essential Oils and Aromatherapy*”, Element Books Ltd., Londyn, Wielka Brytania, 1992
- [114] R. Caddy, „*Essential Oils in Color*”, Amberwood Publishing, Kent, Wielka Brytania, 1997
- [115] S. Price, „*Aromatherapy Workbook*”, Thorsons, Londyn, Wielka Brytania, 2000
- [116] M. Sajewicz, Ł. Wojtal, D. Staszek, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **33**, 936-947 (2010)
- [117] A. Koch, S. Basar, R. Richter, rozdz. 18 „*Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*” (praca zbiorowa pod red. M. Waksmundzkiej-Hajnos, J. Shermy, T. Kowalskiej), CRC Press, Boca Raton, USA, 2008, str. 451-480
- [118] M. Sajewicz, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **22**, 499-513 (2010)
- [119] A. Koch, S. Basar, R. Richter, rozdz. 16 „*Preparative Layer Chromatography*” (praca zbiorowa pod red. J. Shermy i T. Kowalskiej), CRC Press, Boca Raton, 2006, str. 391-412
- [120] M. Daszykowski, M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, D. Staszek, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak, *Acta Chromatogr.*, **21**, 513-530 (2009)

- 
- [121] C. Mathis, G. Ourisson, *Phytochem.*, **3**, 115-131 (1964)
- [122] M. Sajewicz, Ł. Wojtal, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. *Planar Chromatogr.*, **23**, 270-276 (2010)
- [123] M. Sajewicz, Ł. Wojtal, M. Natić, D. Staszek, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011 – praca przyjęta do druku
- [124] R. Randrianarivelo, S. Sarterb, E. Odouxc, P. Bratc, M. Lebrunc, B. Romestandd, C. Menute, H.S. Andrianoelisoaf, M. Raherimandimbyg, P. Danthuh, *Food Chem.*, **114**, 680-684 (2009)
- [125] M.D. Guillen, N. Cabo, J. Burillo, J. *Sci. Food Agric.*, **70**, 359-363 (1996)
- [126] N.S.L. Perrya, C. Bollenb, E.K. Perryb, C. Ballardc, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **75**, 651-659 (2003)
- [127] E. Langa, G. Della Porta, A.M.F. Palavra, J.S. Urieta, A.M. Mainar, J. *Supercrit. Fluids*, **49**, 174–181 (2009)
- [128] S. Zrira, C. Menut, J.M. Bessiere, A. Elamrani, B. Benjilali, 22-èmes Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits; Digne Les Bains (Francja), 5-7 września 2003
- [129] M.J. Jordán, C. Martínez, M.I. Moñino V. Lax, M. Quilez, J.A. Sotomayor, I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs; Antalya (Turcja), 29 kwietnia - 4 maja 2007
- [130] G. Fournier, N. Pages, I. Cosperec, *Planta Med.*, **59**, 96-97 (1993)
- [131] S. Passannanti, M. Paternostro, F. Piozzi, *Phytochem.*, **22**, 1044-1045 (1983)
- [132] J. Escudero, L. Perez, R.M. Rabanal, S. Valverde, *Phytochem.*, **22**, 85-587 (1983)
- [133] G. Janicsak, K. Veres, A.Z. Kakasy, I. Mathe, *Biochem. System. Ecol.*, **34**, 392-396 (2006)
- [134] S.E. Kintzios, "Sage – the Genus *Salvia*", Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Holandia, 2000
- [135] P. Bradesi, A. Bighelli, F. Tomi, J. Casanova, *Can. J. Appl. Spectrosc.*, **41**, 15-24 (1996)
- [136] P. Bradesi, A. Bighelli, F. Tomi, J. Casanova, *Can. J. Appl. Spectrosc.*, **41**, 41-50 (1996)
- [137] M.-L. Lota, D. de Rocca Serra, F. Tomi, J. Casanova, *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 77-104 (2001)

- 
- [138] S. Rezzi, C. Cavaleiro, A. Bighelli, L. Salgueiro, A. Proença da Cunha, J. Casanova, *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 179-188 (2001)
- [139] B. Ferrari, F. Tomi, J. Casanova, *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**, 445-449 (2005)
- [140] J.B. Boti, A. Muselli, F. Tomi, G. Koukoua, T.Y. N'Guessan, J. Costa, J. Casanova, *C.R. Chimie*, **9**, 164-168 (2006)
- [141] K. Liu, P.-G. Rossi, B. Ferrari, L. Berti, J. Casanova, F. Tomi, *Phytochemistry*, **68**, 1698-1705 (2007)
- [142] M. Matlengiewicz, N. Henzel, D. Czachowska, F. Schmit-Quiles, D. Nicole, J. C. Lauer, *Fuel*, **73**(6), 843 (1994A)
- [143] A. Bighelli, J. Casanova, rozdz. 8 "Essential Oil-Bearing Grasses", praca zbiorowa pod red. A. Akhili, CRC Press, Boca Raton, 195-222, 2010
- [144] M. Sajewicz, M. Matlengiewicz, J. Rzepa, Ł. Wojtal, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.*, **23**, 181-190 (2011)
- [145] Y.-Z. Liang, P. Xie, K. Chan, *J. Chromatogr. B*, **812**, 53-70 (2004)
- [146] J.H. Christensen, G. Tomasi, A.B. Hansen, *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 255-260 (2005)
- [147] K.M. Aberg, R.J.O. Torgrip, S.P. Jacobsson, *J. Chemometrics*, **18**, 456-473 (2004)
- [148] G. Malmquist, *J. Chromatogr. A*, **687**, 89-100 (1994)
- [149] A.M. van Nederkassel, C.J. Xu, P. Lancelin, M. Sarraf, D.A. MacKenzie, N.J. Walton, F. Bensaid, M. Lees, G.J. Martin, J.R. Desmurs, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1120**, 291-298 (2006)
- [150] M. Daszykowski, B. Walczak, *TrAC*, **25**, 1081-1096 (2006)
- [151] D.L. Massart, L. Kaufman, *The interpretation of analytical chemical data by the use of cluster analysis*, R.E. Krieger Publishing Company, USA, 1989
- [152] F.C. Sánchez, B. van den Bogaert, S.C. Rutan, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **34**, 139-171 (1996)
- [153] A. de Juan, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta*, **500**, 195-210 (2003)
- [154] M. Daszykowski, B. Walczak, D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **65**, 97-112 (2003)
- [155] <http://www-stat.stanford.edu/software/wavelab/index.html>
- [156] [http://www.models.kvl.dk/source/DTW\\_COW/index.asp](http://www.models.kvl.dk/source/DTW_COW/index.asp)

- 
- [157] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, M.J. vander Werf, *BCM Genomics*, **7**, 142 (2006)
- [158] M.M.W.B. Hendriks, L. Cruz-Juarez, D. De Bont, R.D. Hall, *Anal. Chim. Acta*, **545**, 53-64 (2005)
- [159] Data Preprocessing, „Comprehensive Chemometrics” (praca zbiorowa pod red. S.D. Browna, R. Taulera, B. Walczak), Elsevier, Amsterdam, Holandia, vol. 2, 2009

# Fingerprint of Selected *Salvia* Species by HS–GC–MS Analysis of Their Volatile Fraction

Józef Rzepa<sup>1</sup>, Łukasz Wojtal<sup>1</sup>, Dorota Staszek<sup>1</sup>, Gabriela Grygierczyk<sup>1</sup>, Karina Labe<sup>1</sup>, Michał Hajnos<sup>2</sup>, Teresa Kowalska<sup>1</sup>, and Monika Waksmundzka-Hajnos<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Str., Katowice, Poland; <sup>2</sup>Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, 1 Chodźki Str., 20-093 Lublin, Poland; <sup>3</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Str., 20-081 Lublin, Poland

## Abstract

Twenty species of *Salvia*, naturally grown or cultivated in Poland, are investigated by headspace gas chromatography–mass spectrometry analysis. The main components of the volatile fraction of *Salvia* species are identified as  $\alpha$ -pinene, camphene,  $\beta$ -pinene, thujol, camphor,  $\beta$ -chamigrene, and cadina-3,9-diene. There are also the compounds that can be considered as chemotaxonomic markers, namely  $\beta$ -myrcene for *Salvia lavadulifolia*,  $\beta$ -phelandrene for *Salvia verticillata*,  $\gamma$ -terpinene for *Salvia stepposa*, and isocaryophyllene and caryophyllene for *Salvia officinalis*. Certain compounds (such as *o*-cymene present in *Salvia canariensis* and *Salvia stepposa*;  $\beta$ -trans-ocymene present in *Salvia lavadulifolia*, *Salvia sclarea*, and *Salvia amplexicaulis*; thujenone present in *Salvia staminea*, *Salvia atropatana*, *Salvia jurisicii*, and *Salvia officinalis*; and thujone present in *Salvia azurea*, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia hians*, and *Salvia triloba*) can constitute chemotaxonomic advice for the aforementioned species. Also, the lack of certain compounds otherwise common in the individual sage species can be considered as chemotaxonomic advice (e.g., *Salvia sclarea* has no  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene; *Salvia lavadulifolia* lacks camphene; *Salvia triloba* lacks  $\beta$ -pinene and camphene; and *Salvia officinalis* lacks  $\beta$ -chamigrene, thujol, and cadina-3,9-diene).

## Introduction

Genus *Salvia* L. (Lamiaceae), commonly known as sage, derives its name from the Latin verb “salvere,” which means “to be in good health” or “to be well” (1). *Salvia* is one of the larger genera belonging to the subfamily *Nepetoideae* and contains ~900 species (2), which are widely distributed in the temperate, subtropical, and tropical regions of the globe but are rare in the Arctic or Alpine regions (3,4). A large number of the aromatic taxa make this family commercially important, owing to their odors, infusions, tinctures, and flavors that are used as components of herbal products (5). Genus *Salvia* makes nearly one quarter of the recognized genera of the *Lamiaceae*, and it is rec-

ognized around the world for having commercial, medicinal, and cultural importance, due to useful essential oils produced by *Salvia* foliage (6,7). A number of *Salvia* species have been cultivated as ornamental plants for their aromatic and aromatherapeutic properties or for the confectionery as culinary herbs (3). Approximately 30 *Salvia* species naturally grow or are cultivated in Poland (8). Medicinal applications of *Salvia* herbs are diverse due to a different pharmacological activity of certain species. Some of them are applied as alimentary tract stimulators and digestion regulators with additional antiseptic properties. Other *Salvia* species are known for their antipyretic, analgesic, and expectorant properties, and they are readily applied in therapy of influenza and the cold. Still some other species are used in therapy of psychoses, depressions, and neuroses due to sedative properties of the respective decoctions. Application of sage against menstruation disorders was also reported (9).

Essential oils are always a mixture of up to several hundred constituents, most of them being hydrocarbons and oxygenated compounds (10). They represent a small fraction of a plant's composition, yet they possess an interesting pharmacological activity. Terpenes are responsible for antiphlogistic, antihistaminic, and antiallergic properties of *Salvia* (11). For antibacterial and antifungal activity of essential oils, such compounds are responsible (e.g.,  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, borneol, and bornyl acetate) (12,13). Certain components of essential oils ( $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, and camphene) additionally show spasmolytic activity (14,15). Composition of essential oils from certain *Salvia* species is described in literature (16–23).

Chromatographic fingerprinting is one of the most popular methods in herbal medicine studies, and it has been widely introduced and accepted by the World Health Organisation, Food and Drug Administration, European Medicines Agency, German Commission E, British Herbal Medicine Association, and Indian Drug Manufacturers' Association (24). According to its definition, a chromatographic fingerprint is a chromatogram that represents chemical characteristics of the herb (25). According to the majority of published methods, chromatographic fingerprints of herbs have been constructed based on a single chromatogram (26–29). These methods are usually focused on

Corresponding author: email monika.hajnos@am.lublin.pl





qualitative and quantitative determination of individual known compounds or of a small set of several compounds.

The aim of this paper is to make a comparison of the volatile fractions originating from the selected *Salvia* species that grow and are cultivated in Poland in order to find similarities and differences in chemical composition and biological activity among particular species and to check chemotaxonomic markers for the individual species.

## Materials and Methods

### Plant material

Samples of *Salvia* species investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of Medical University (Lublin, Poland) in August 2007. These *Salvia* species are typical of the temperate climatic zone and are used for diverse purposes. Certain species (e.g., *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. pratensis*, *S. deserti*, *S. sclarea*, *S. canariensis*, *S. amplexicaulis*, and *S. atropatana*) reveal the well-pronounced pharmacological activity and hence, they are used as medicinal herbs. Some other species (*S. azurea*, *S. lavandulifolia*, *S. cadmica*, *S. triloba*, and *S. glutinosa*) are used as fragrance spices or perfume components. Finally, *S. verticillata*, *S. nemorosa*, and *S. tesquicola* are the appreciated honey-yielding plants. Numerous *Salvia* species (e.g., *S. azurea*, *S. pratensis*, *S. hians*, and *S. jurisicii*) are grown as ornamental plants and decorate flower beds in many gardens worldwide. The botany specialists identified each investigated species, and voucher specimens are deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University (Lublin, Poland). The investigated species are listed in Table I.

Plant material was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35°C to 40°C. Then the obtained dry material was stored in a refrigerator until the commencement of the analysis. Finally, 1 g of each plant species was weighed, powdered in a porcelain mortar, and placed in 10-mL glass vials stoppered with a silicon-teflon septum. Three replicates of each sample were processed in an identical way.

### Headspace gas chromatography–mass spectrometry

The headspace gas chromatography–mass spectrometry (HS–GC–MS) analyses were carried out with use of a TRACE 2000 model GC with an MS TRACE model mass detector (ThermoQuest, Waltham, MA), equipped with a CTC Analytics model autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland), used in the headspace mode. Temperature and time of the headspace desorption were, respectively, 70°C and 15 min. 0.5 mL of the headspace phase was introduced on to the DB-5 capillary column (30 m  $\leftrightarrow$  0.25 mm i.d., 0.25- $\mu$ m film thickness; Agilent Technologies, Palo Alto, CA). Helium ( $p = 100$  kPa) was used as carrier gas. Gradient analysis was run using the following temperature program: 40°C (3 min); 40–150°C (8°C/min); and 150°C (15 min). The temperature of the injector was kept constant at 150°C. Mass spectrometer was fitted with an EI source operated at 70 eV. Identification of individual compounds was based on a comparison of the obtained mass spectra of the individual chromatographic peaks with those valid for the standards and avail-

able from the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD) software library. A comparison was also carried out of the retention times valid for individual peaks from the *Salvia* samples with those of the known ether oils components. To this effect, we used pine oil, peppermint oil, eucalyptus oil, and juniper oil as the sets of the volatile standards (Apotheca Pacis, Rybnik, Poland).

The identified compounds are listed in Table I. Relative contributions of individual volatile compounds contained in each individual *Salvia* species to the overall volatile fraction were evaluated from the respective peak heights. As is the case with most chromatograms recorded by the tandem GC–MS system, the presented evaluation is of semi-quantitative importance only; this is because it does not take into the account individual ionization yields of individual volatile compounds.

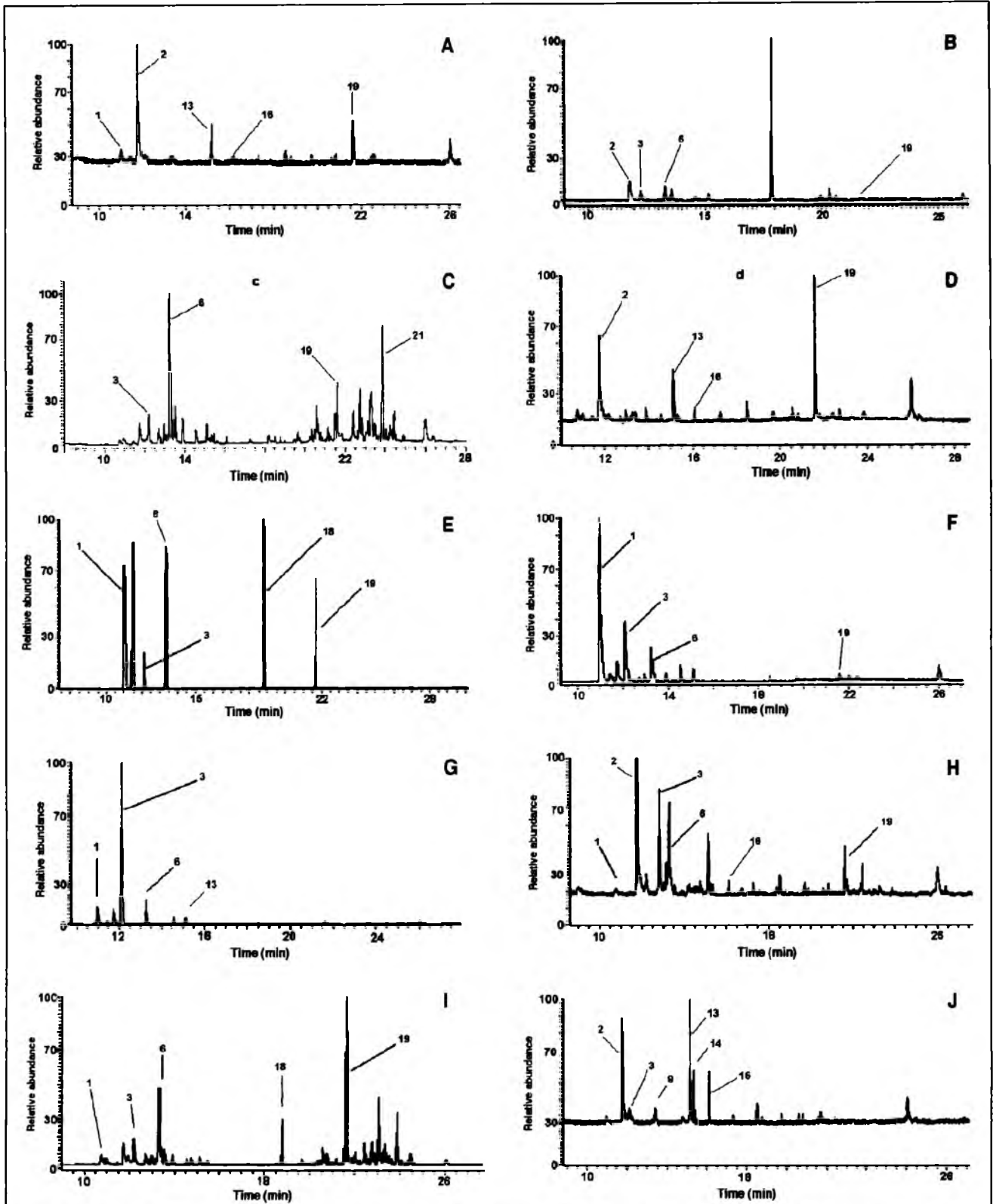
## Results and Discussion

Gas chromatograms of the investigated *Salvia* species have perceptibly differentiated profiles (Figure 1). Retention times of a volatile fraction are contained within a relatively wide interval ranging from 8–27 min. Most of the investigated species (e.g., *S. azurea*, *S. verticillata*, *S. pratensis*, *S. staminea*, *S. cadmica*, *S. sclarea*, *S. canariensis*, *S. glutinosa*, *S. nemorosa*, and *S. tesquicola*) have their volatile compounds distributed within a wide range of the retention times. Some other species (e.g., *S. lavandulifolia*, *S. deserti*, *S. forskahlei*, *S. triloba*, *S. atropatana*, *S. stepposa*, and *S. jurisicii*) are rich in compounds characterized by low retention times, whilst *S. hians* is rich in compounds of higher retention times.

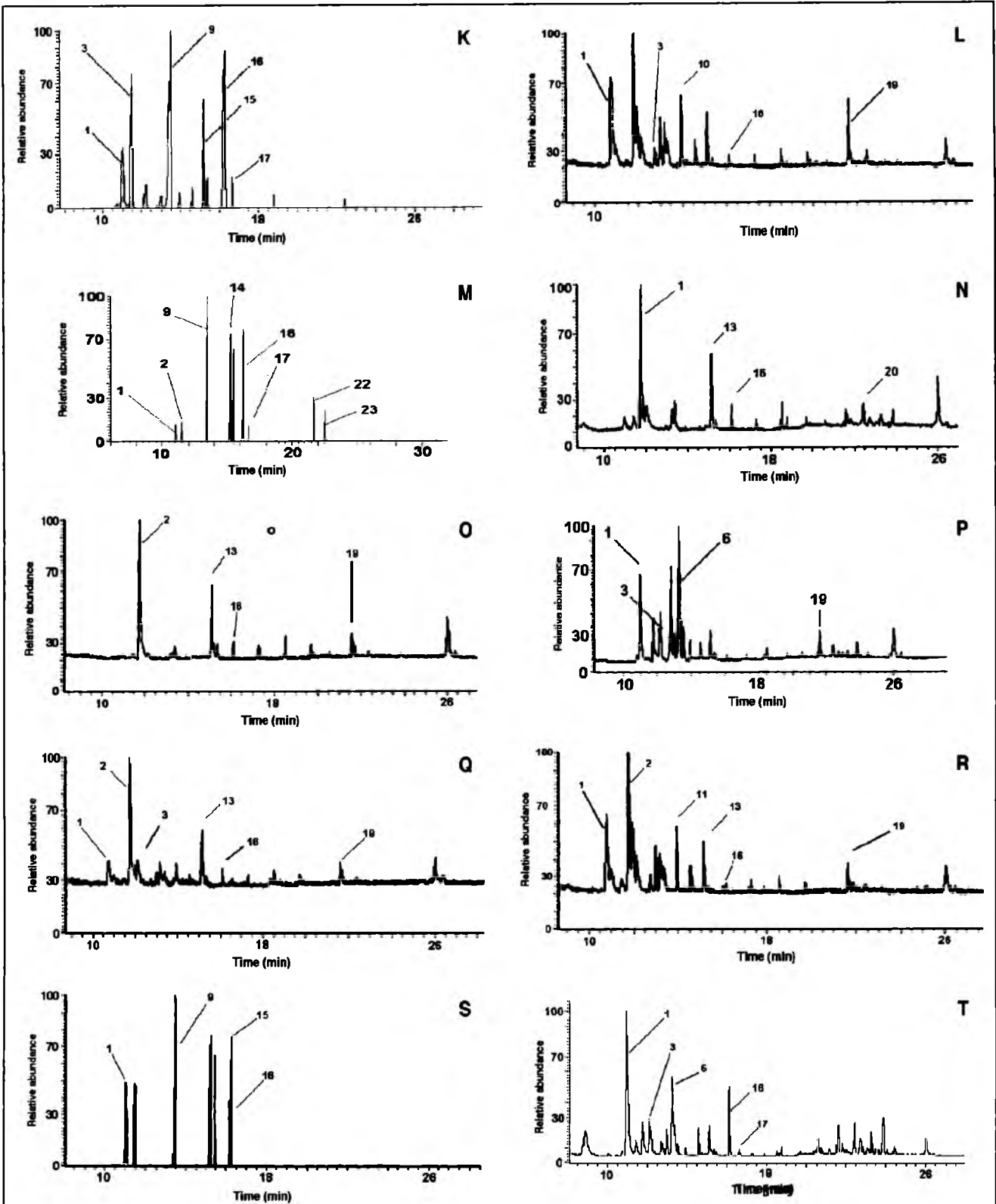
The identified volatile compounds are listed in Table I. Seven compounds appear in most of the investigated species, and these are  $\alpha$ -pinene (present in 19 species), camphene (present in 18 species),  $\beta$ -pinene (present in 17 species), thujol (present in 16 species), camphor (present in 14 species),  $\beta$ -chamigrene (present in 18 species), and cadina-3,9-diene (present in 13 species). In Table II, we show the chemical structures of the aforementioned seven volatile compounds most frequently appearing in the examined *Salvia* species and their respective mass spectra.

There are some other compounds that are relatively rare with the investigated sage species. For the sake of an example,  $\beta$ -myrcene was found in *S. lavandulifolia*,  $\beta$ -phelandrene was found in *S. verticillata*,  $\tau$ -terpinene was found in *S. stepposa*, and isocaryophyllene and caryophyllene were found in *S. officinalis*. These compounds can be regarded as chemotaxonomic markers for the aforementioned species. Such compounds as *o*-cymene (present in *S. canariensis* and *S. stepposa*),  $\beta$ -trans-ocymene (present in *S. lavandulifolia*, *S. sclarea* and *S. amplexicaulis*), thujone (present in *S. staminea*, *S. atropatana*, *S. jurisicii* and *S. officinalis*), as well as thujone (present in *S. azurea*, *S. lavandulifolia*, *S. hians* and *S. triloba*) can be regarded as chemotaxonomic advice for the respective sage species.

Also the lack of certain (otherwise frequently occurring) compounds in some *Salvia* species provides chemotaxonomic advice for these particular species. In *S. sclarea*, no  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene can be found, *S. lavandulifolia* has no camphene, *S.*

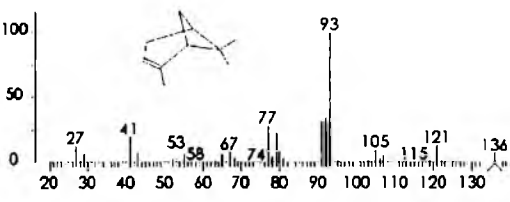
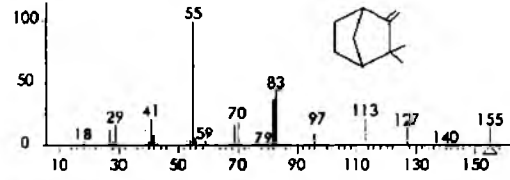
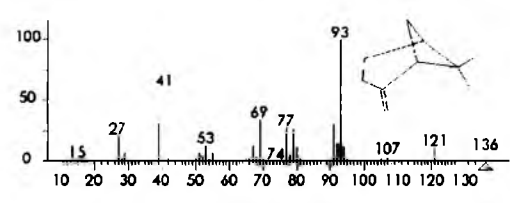
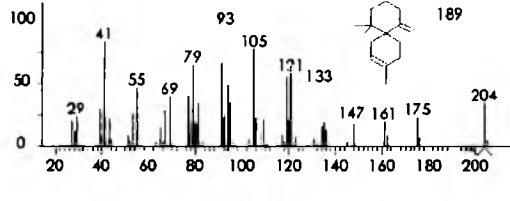
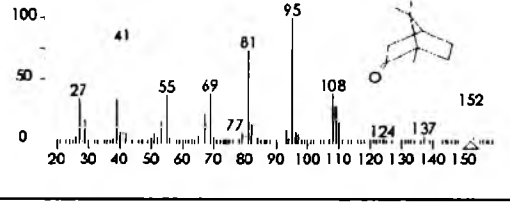
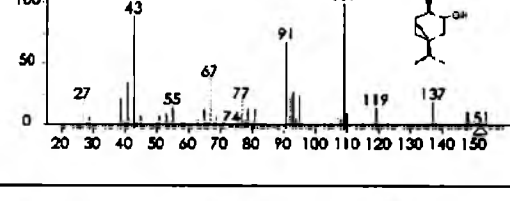
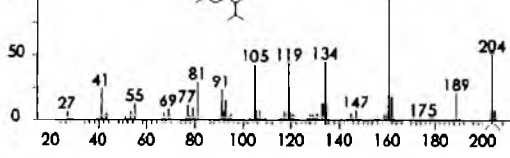


**Figure 1.** Fingerprint gas chromatograms of the volatile fraction determined by means of HS–GC–S for the following *Salvia* species: *S. amplexicaulis*, A; *S. atropatana*, B; *S. azurea*, C; *S. cadmica*, D; *S. canariensis*, E; *S. deserta*, F; *S. farskaohlei*, G; *S. glutinosa*, H; *S. hians*, I; *S. jurisicii*, J; *S. lavandulifolia*, K; *S. nemorosa*, L; *S. officinalis*, M; *S. pratensis*, N; *S. sclarea*, O; *S. staminea*, P; *S. stepposa*, Q; *S. tesquicola*, R; *S. triloba*, S; and *S. verticillata*, T. Selected (i.e., most abundant and/or best separated) peaks are labeled according to the numbering attributed to them in Table I.



**Figure 1.** (Continued) Fingerprint gas chromatograms of the volatile fraction determined by means of HS-GC-S for the following *Salvia* species: *S. amplexicaulis*, A; *S. atropatana*, B; *S. azurea*, C; *S. cadmica*, D; *S. canariensis*, E; *S. deserta*, F; *S. farskaohlei*, G; *S. glutinosa*, H; *S. hians*, I; *S. jurisicii*, J; *S. lavandulifolia*, K; *S. nemorosa*, L; *S. officinalis*, M; *S. pratensis*, N; *S. sclarea*, O; *S. staminea*, P; *S. stepposa*, Q; *S. tesquicola*, R; *S. triloba*, S; and *S. verticillata*, T. Selected (i.e., most abundant and/or best separated) peaks are labeled according to the numbering attributed to them in Table I.

Table II. Seven Volatile Compounds Most Frequently Appearing in the *Salvia* Species With Their Respective Structural Formulas and Mass Spectra

Volatile Compound	Structural Formulas and Mass Spectra
$\alpha$ -Pinene	
Camphene	
$\beta$ -Pinene	
$\beta$ -Chamigrene	
Camphor	
Thujol	
Cadina-3,9-diene	

*triloba* contains no  $\beta$ -pinene, and camphene, and *S. officinalis* is deprived of  $\beta$ -chamigrene, thujol, and cadina-3,9-diene.

There are still other volatile components, which remain unidentified in our experiment, yet they frequently appear in many investigated sage species. For the sake of an example, component with the retention time equal to 26.01 min is present in fourteen *Salvia* species, and its relatively highest levels are observed with *S. azurea*, *S. pratensis*, *S. staminea*, *S. cadmica*, and *S. sclarea*.

Conclusions

In our HS-GC-MS study, we obtained fingerprint gas chromatograms of the volatile fraction from 20 *Salvia* species most frequently grown in Poland. Seven volatile compounds were identified as characteristic of the prevailing majority of the investigated species. With four species, unique volatile compounds were found, enabling them to act as their respective chemotaxonomic markers. With 13 species, certain volatile compounds were identified, which (although not unique for these species) can be considered as their respective chemotaxonomic advice. With five species, an absence of the otherwise frequently occurring volatile compounds was observed, which can be considered as a respective chemotaxonomic advice, as well.

References

1. M. Roberts. Margaret Roberts' Book of Herbs: The Medicinal and Culinary Uses of Herbs in South Africa. Southern Book Publishers, National Book Printers, Goodwood, Cape, 1986.
2. R.D. Cantino, R.M. Hariey, and S.J. Wagstaff. Genera of Labiatae: status and classification. In: Advances In Labiatae Science. Eds, R.M Hariey and T. Reynolds. Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 1992, pp, 511-522.
3. L.E.W. Codd. Lamiaceae. In: Flora of Southern Africa 28,4. Botanical Research Institute, Pretoria, 1985.
4. I.C. Hedge. A global survey of the biogeography of the Labiatae. In: Advances in Labiatae Science. Eds, R.M Hariey and T. Reynolds. Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 1992, pp. 7-17.
5. B.M. Lawrence. Chemical components of Labiatae oils and their exploitation. In: Advances in Labiatae Science. Eds, R.M Hariey and T. Reynolds. Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 1992, pp. 399-436.
6. S.J. Wagstaff. A phylogenetic interpretation of

- pollen morphology in tribe MerAheae (Labiatae). In: *Advances in Labiatae Science*. Eds, R.M. Hariey and T. Reynolds. Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 1992, pp. 113–124.
7. M. Ahmed, I.P. Ting, and R.W. Scora. Leaf oil composition of *Salvia hispanica* L. from three geographical areas. *J. Essent. Oil Res.* **6**: 223–228 (1994).
8. Z. Mirek, H. PiEkoS Mirkowa, A. ZajAc and M. ZajAc. Vascular Plants of Poland – A Checklist. Władysław Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Science, Kraków, 1995.
9. Y. Okuno and M. Miyazawa. Suppressive components in *Salvia miltiorrhiza* against Trp-P-1 and activated Trp-P-1-induced SOS response using *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 Umu test. *Lett. Drug Des. Discov.* **1**: 66–68 (2004).
10. A. Anitescu, C. Doneanu, and V. Radulescu. Isolation of coriander oil: Comparison between steam distillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction. *Flav. Fragr. J.* **12**: 173–176 (1997).
11. C.J. Stevensen. Aromatherapy in dermatology. *Clin. Dermatol.* **16**: 689–694 (1998).
12. J.C. Chaichat, R.P. Garry, C. Menut, G. Lamaty, R. Madhuret, and J. Chopineau. Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. VI. Activity of some African essential oils. *J. Essent. Oil Res.* **9**: 67–75 (1997).
13. H.J.D. Dorman and S.G. Deans. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 308–316 (2000).
14. A.J. Al-Mosavi. A possible role of essential oil terpenes in the management of childhood urolithiasis. *Therapy.* **2**: 243–247 (2005).
15. C.W. Bak, S.J. Yoon, and H. Chung. Effects of an  $\alpha$ -blocker and terpene mixture for pain control and spontaneous expulsion of ureter stone. *Korean J. Urology.* **48**: 517–521 (2007).
16. M. Viljoen Alvaro, A. Gono-Bwalya, G. P. P. Kamatou, K. Hüsni, C. Baser, and B. Demirci. The essential oil composition and chemotaxonomy of *Salvia stenophylla* and its allies *S. repens* and *S. runcinata*. *J. Essent. Oil Res.* **18**: 37–45 (2006).
17. A. Somboli, A.R. Fakhari, and F. Sefidkon. Chemical composition of the essentials oil of *Salvia macilenta* from Iran. *Chem. Nat. Comp.* **41**: 168–170 (2005).
18. G. Ozek, T. Ozek, K.H.C. Baser, E. Hamzaoglu, and A. Duran. Composition of essential oils from *Salvia anatolica*, a new species endemic from Turkey. *Chem. Nat. Comp.* **43**: 667–671 (2007).
19. M. H. Mirjalili, P. Salehi, A. Somboli, and M. Mohammadi Vala. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during the phonological cycle. *Chem. Nat. Comp.* **42**: 19–23 (2006).
20. M. Maksimovic, D. Vidic, M. Mikloš, M. Edita Šolic, and S. Abadzic. Effect of the environmental conditions on essential oil profile in two Dinaric *Salvia* species: *S. brachyodon* Vandas and *S. officinalis* L. *Biochem. System. Ecol.* **35**: 473–478 (2007).
21. M. Kelen and B. Tepe. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. *Bioresource Technol.* **99**: 4096–4104 (2008).
22. F. Senatore, N.A. Arnold, and F. Piozzi. Chemical composition of the essential oil of *Salvia multicaulis* Vahl. var. *simplifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *J. Chromatogr. A.* **1052**: 237–240 (2004).
23. G.N. Farhat, N.I. Affara, and H.U. Gali-Muhtasib. Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. *Toxicaon.* **39**: 1601–1605 (2001).
24. X.H. Fan, Y.Y. Cheng, Z.L.Ye, R.Ch. Lin, and Z.Z. Qian. Multiple chromatographic fingerprinting and its application to the quality control of herbal medicines. *Anal. Chim. Acta.* **555**: 217–224 (2006).
25. S. Cui, B. Fu, F. Sen-Chun Lee, and X. Wang. Application of microemulsion thin layer chromatography for the fingerprinting of licorice (*Glycyrrhiza* spp.). *J. Chromatogr. B.* **828**: 33–40 (2005).
26. P. Xie, S. Chen, Y.Z. Liang, X. Wang, R. Tian, and R. Upton. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *J. Chromatogr. A.* **1112**: 171–180 (2006).
27. L.W. Yang, D.H. Wu, X. Tang, W. Peng, X.R. Wang, Y. Ma, and W.W. Su. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection. *J. Chromatogr. A.* **1070**: 35–42 (2005).
28. S.B. Chen, H.P. Liu, R.T. Tian, D.J. Yang, S.L. Chen, H.X. Xu, A.S.C. Chan, and P.S. Xie. High-performance thin-layer chromatographic fingerprints of isoflavonoids for distinguishing between *Radix Puerariae Lobate* and *Radix Puerariae Thomsonii*. *J. Chromatogr. A.* **1121**: 114–119 (2006).
29. R. Oprean, M. Tamas, R. Sandulescu, and L. Roman. Essential oils analysis. I. Evaluation of essential oils composition using both GC and MS fingerprints. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**: 651–657 (1998).

Manuscript received  
Revision received

## GC-MS Study of the Performance of Different Techniques for Isolating the Volatile Fraction from Sage (*Salvia* L.) Species, and Comparison of Seasonal Differences in the Composition of this Fraction

M. SAJEWICZ<sup>1</sup>, J. RZEPA<sup>1</sup>, M. HAJNOS<sup>2</sup>, Ł. WOJTAL<sup>1</sup>, D. STASZEK<sup>1</sup>,  
T. KOWALSKA<sup>1</sup>, AND M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS<sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, Katowice, Poland

<sup>2</sup>Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin,  
1 Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

<sup>3</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin,  
6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland  
E-mail: monika.hajnos@am.lublin.pl

**Summary.** Application of chemotaxonomy to the plant kingdom can be regarded as a future challenge to the traditional binomial classification system. Construction of a classification system based on the chemical composition of plants has only recently become possible with the development of sophisticated chromatographic and hyphenated techniques. Successful chemotaxonomy can, however, be achieved only if sufficient experimental evidence is collected confirming the reproducibility of the chemical composition of plant species (irrespective of the specimen, its growing season, location of the collection site, etc.). The objective of this study was to compare, by use of gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) the efficiency of isolation of volatile compounds from five different *Salvia* L. (sage) species (*S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*) by use of four different techniques [head-space extraction at 70 and 80°C, vapour distillation in a Deryng apparatus, and accelerated solvent extraction (ASE)]. We also compared the composition of the volatile fractions of these species collected during two different seasons (2007 and 2008). It was established that the composition of the volatile fractions is very dependent on the species considered and, in a much less pronounced way, on the growing season. This statement is valid irrespective of the technique used to isolate the volatile compounds from the plant matrix. The seasonal reproducibility of the compounds regarded as chemotaxonomic markers and chemotaxonomic advice compounds (and the repeated absence of such compounds from a species) makes the volatile fraction suitable for chemotaxonomic evaluation of sage. Finally, it was shown that head-space extraction of the volatile fraction at 70°C was the best extraction technique for the purpose of this study.

**Key Words:** sage (*Salvia* L.) species, volatile compounds, head-space GC-MS, Deryng vapour distillation, accelerated solvent extraction (ASE), chemotaxonomy

## Introduction

Identification of plant species and varieties can be performed by a variety of methods. The oldest are macroscopic investigations, then microscopic and microchemical methods [1]. Very often these methods are insufficient for precise identification of plant material, because of the similarities of different species. Modern analytical methods have recently enabled chemotaxonomic classification of species.

Plant drugs are frequently offered in pulverized or homogenized form, sometimes as succuses, juices, and extracts, often as pills or capsules. Dietary supplements, nutraceuticals, traditional Chinese medicines, or Ayurvedic drugs are only a few from among a great diversity of commercially available phytopharmaceuticals. Botanicals are believed to be very safe and at the same time not very effective drugs, yet nothing could be less true than this statement. When overdosed or not properly prepared, many herbal medicines cause severe side effects. The recent global resurgence of interest in herbal medicines has led to an increased demand for these preparations, which has resulted in a decline in quality. The current need is to establish a systematic approach to standardization of herbal raw materials and herbal formulations and to develop well-designed methods for this purpose [2]. A variety of methods can be used for phytochemical standardization of herbal raw materials and polyherbal formulations, for example preliminary phytochemical screening, fingerprint profiling, and quantification of marker compounds.

By analogy with genomics or proteomics, the study of small-molecule metabolite profiles is called metabolomics [3], where 'metabolome' denotes the complete set of small-molecule metabolites (for example metabolic intermediates, hormones and other signalling molecules, and the secondary metabolites) found in a biological sample, for example a single organism [4]. Metabolomic approaches are under dynamic development and several synonyms have been suggested, for example metabonomics [5], metabolite profiling [6], or fingerprinting [7–9].

Among a variety of quality-control methods applied to herbal materials, chromatographic fingerprinting has recently attracted more attention, especially because of the lack of authentic standard substances for identification of the active components [10]. A chromatographic fingerprint is a chromatogram that represents the chemical characteristics of a herbal medicine [11].

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomic profiling methods have been developed and used for profiling of plant metabolites since the 1980s, yet in the course of the past few years only has this



technique been used on a wider scale for metabolomic studies of plants, animals, and humans, with the objective of toxicological studies and biomarker discovery, disease diagnosis, and classification.

GC-MS is ideally suited to the analysis of non-polar analytes, for example synthetic organic compounds and hydrophobic natural products, and has traditionally been used for this purpose. GC-MS is distinctly different from the two other and better established analytical methods used in metabolomics, i.e. nuclear magnetic resonance (NMR) and liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC-MS), in the sense that it covers a unique range of analyte polarity. It has been found that the overlap between the GC-MS and LC-MS metabolomic profiling data is limited, because of differences between the separation and ionization mechanisms. GC-MS is highly sensitive and, therefore, can be used for the analysis of less commonly encountered types of sample that might only be available in very small amounts.

Thus with an advanced and very diverse variety of separation tools at our disposal, chemotaxonomy of plants has, for the first time, become an available and, therefore, tempting target. Even the excellent performance of modern chromatography does not, however, guarantee successful development of chemotaxonomy. The crucial issue seems to be, e.g., repeatable appearance of plant constituents selected as its biomarkers, irrespective of the growing season and other external factors.

The objective of this study was to compare, by use of gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS) the efficiency isolation of volatile compounds from the five different *Salvia* L. species (*S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*) by use of four different isolation techniques [the head-space extraction at 70 and 80°C, vapour distillation in the Deryng apparatus, and accelerated solvent extraction (ASE)]. We also compared the composition of the volatile fraction from samples of these species obtained during two different growing seasons (2007 and 2008). From this comparison we tried to assess the usefulness for chemotaxonomy of the volatile fraction derived from these plant species.

## Experimental

### Plant Material

Samples of the five different sage species investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, on August 20th, 2007 and on October 20th, 2008. Plant material was dried at 35 to 40°C for 40 h in an oven with a forced air flow. The dry mate-

rial obtained was then stored until analysis in the deep-freeze compartment of refrigerator. Finally, each plant species was weighed (2 g for head-space gas chromatography and accelerated solvent extraction or 50 g for vapour distillation in the Deryng apparatus) and powdered in a porcelain mortar. Three replicates of each sample were processed identically.

### **Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection (GC-MS)**

GC-MS and HS-GC-MS analysis was performed by use of a Trace model 2000 capillary gas chromatograph with a model MS Trace mass detector (ThermoQuest, Waltham, MA USA), equipped with a CTC Analytics auto-sampler (Combi PAL, Basel, Switzerland), working in the head-space and non-head-space modes. Compounds were separated on a 30 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 µm, DB-5 capillary column (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA; formerly J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium ( $p = 100$  kPa) was used as carrier gas. The oven temperature was maintained at 40°C for 3 min after injection, then programmed at 8° min<sup>-1</sup> to 150°C which was held for 15 min. The injector, temperature was 150°C. The mass spectrometer was equipped with an EI source operated at 70 eV.

### **Techniques Used for Isolating Volatile Compounds from *Salvia* Species**

#### **Head-Space Extraction**

Head-space extraction is a simple and efficient mean of direct isolation of volatile constituents from a liquid or solid matrix. Two desorption temperatures were used, 70 and 80°C. At both temperatures desorption time was 15 min and 0.5 mL head space was introduced to the chromatographic column.

#### **Vapour Distillation in the Deryng Apparatus**

The dried plant material (50 g) was placed in the round-bottomed flask and 400 mL water was added. Vapour distillation was performed for 3 h by use of the Deryng apparatus. The procedure is described in Polish Pharmacopoeia VI [12]. The distillates (1 µL) were analyzed by GC-MS.

### Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Extraction was performed in a Dionex (Sunnyvale, CA, USA) model ASE 200 accelerated solvent extraction unit. The operating conditions were: purge time, 60 s; extracting solvent, petroleum ether; static cycles, 3; oven temperature, 105°C; working pressure, 6.67 Mpa; oven heat-up time, 5 min; static time, 10 min; flush volume, 100%. Petroleum ether was used for isolation of the volatile compounds because it has been recommended elsewhere for this purpose [13].

Each extract obtained by ASE was kept frozen for 24 h at -6°C to separate the ballast constituents. Extracts were then filtered through an Anotop syringe filter with aluminium oxide as adsorbent and 1-μL samples were analyzed by GC-MS.

### Identification of the Volatile Compounds

Identification of individual volatile compounds was based on comparison of their mass spectra with those from standards and spectra available from the NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) library. The retention times of peaks obtained from the *Salvia* samples were also compared with those of compounds known to be present in the essential oils of other plants. For this purpose we used pine oil, peppermint oil, eucalyptus oil, and juniper oil (manufactured by Apotheca Pacis, Rybnik, Poland) as the volatile standards.

## Results and Discussion

The first step in our study was to compare four different techniques for isolating volatile compounds from the crude plant material. This comparison was performed using results obtained from sage samples collected in 2007 only. The results obtained are summarized in *Table I* and *Figs 1-5*.

Table 1. Dependence on method of extraction<sup>a</sup> of the relative amounts of volatile compounds isolated from *S. larundulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa* collected in 2007. The retention times (*t<sub>R</sub>*) of the compounds are also given

Compound	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	<i>Salvia larundulifolia</i>				<i>Salvia staminea</i>				<i>Salvia hians</i>				<i>Salvia triloba</i>				<i>Salvia nemorosa</i>			
		HS-70	HS-80	Deryng	ASE	HS-70	HS-80	Deryng	ASE	HS-70	HS-80	Deryng	ASE	HS-70	HS-80	Deryng	ASE	HS-70	HS-80	Deryng	ASE
$\alpha$ -Pinene	10.97	1.00	0.14	0.91	0.11	1.00	0.56	0.40		1.00				1.00		1.00		1.00	0.27		
Camphene	11.75					1.00	0.71			1.00				1.00				1.00			
$\beta$ -Pinene	12.20	1.00	0.72	0.23		1.00	0.59	0.61		1.00	0.14	0.18		1.00	0.17			0.90	1.00		
$\beta$ -Myrcene	12.25	1.00	0.96	0.28																	
$\alpha$ -Cymene	13.15																	0.83	1.00		
Limonene	13.26					1.00	0.28	0.55		1.00	0.10										
$\beta$ -Phellandrene	13.32							1.00				1.00									
$\beta$ -trans-Ocimene	13.36	0.60	1.00	0.90	0.27			1.00						1.00			0.37				
Eucalyptol	13.50	1.00	0.90	0.95		1.00		0.20		1.00		0.20				0.95					
$\alpha$ -Ocimene	13.91	1.00				1.00												1.00		0.20	
$\gamma$ -Terpinene	13.95																				
<i>p</i> -Menth-1,4-diene	14.59	0.21	1.00															1.00			
Thujol	15.12	0.20	0.29	1.00	0.22	1.00		0.20		1.00				0.89	0.75		1.00	1.00	0.04		
Thujenone	15.35					1.00															
Thujone	15.47	1.00	0.48	0.35				1.00			0.20	1.00		1.00	0.94	0.87	0.38				
Camphor	16.11	0.90	0.06		1.00									0.40	0.75	0.70	1.00	1.00	0.71		
Borneol	16.65	0.22	0.07	1.00				1.00							1.00	0.50					
Bornyl acetate	18.84	0.14	0.62	1.00						1.00						1.00					
$\beta$ -Chamigrene	21.60	0.02	0.54	1.00	0.08	0.25	0.36	1.00	0.24	1.00	0.07	0.65			1.00		0.33	0.50	0.28	1.00	0.21
Cadin-3,9-diene	22.43	0.09	0.39	1.00	0.12	0.33	0.13		0.15	1.00	0.15	0.60			1.00		0.44	1.00			
Myrolene	23.31							1.00		0.15		1.00						1.00			
Isocaryophyllene	21.70							1.00								1.00					
Caryophyllene	22.53							1.00								1.00					
Total no. in species		14	13	11	6	10	6	13	2	11	4	7	0	3	8	10	6	11	5	2	1.00

<sup>a</sup>HS-70, head-space extraction at 70°C; HS-80, head-space extraction at 80°C; Deryng, vapour distillation in a Deryng apparatus; ASE, accelerated solvent extraction. The amount of a compound extracted by the most efficient method is denoted '1'. Yields of less efficient methods are given relative to those for the most efficient methods. Amounts were estimated from peak height

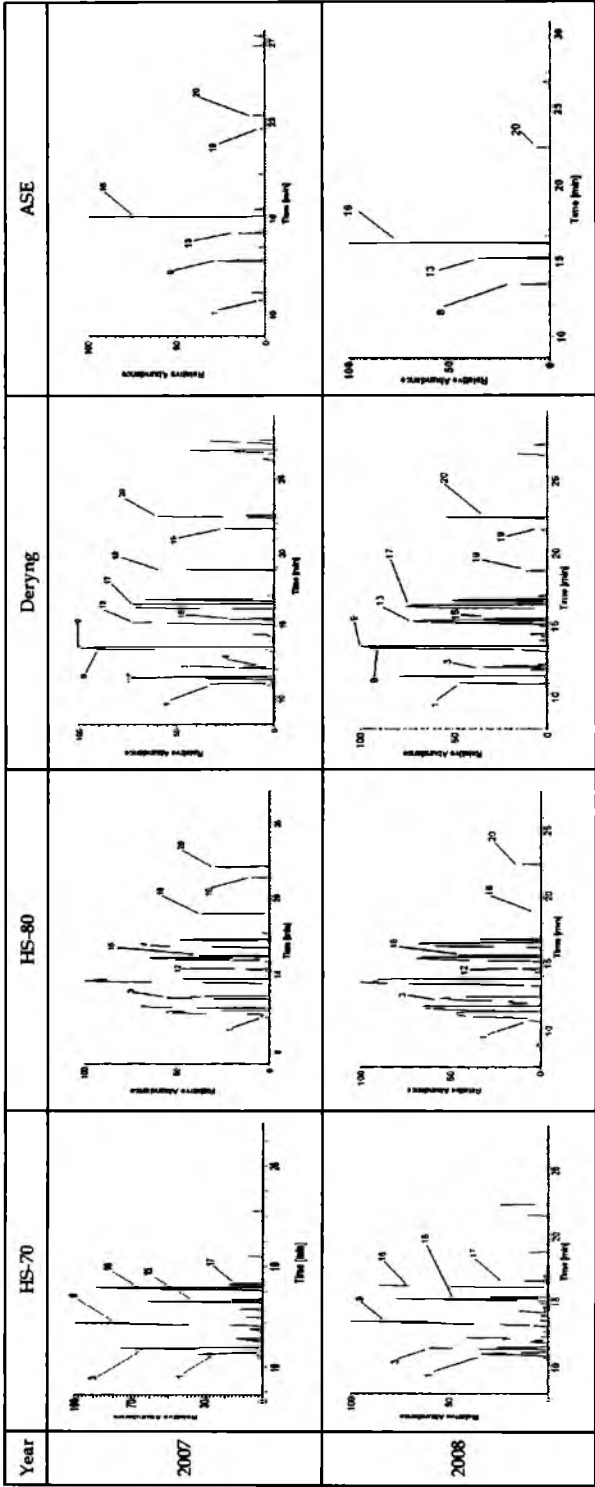


Fig. 1. Comparison of chromatograms showing volatile compounds extracted from *Salvia lavandulifolia* L. collected in 2007 and 2008 by use of: head-space extraction at 70°C (HS-70); head-space extraction at 80°C (HS-80); vapour distillation in a Deryng apparatus (Deryng) and accelerated solvent extraction (ASE). Numbering of the compounds conforms with that given in *Tables I-VI*

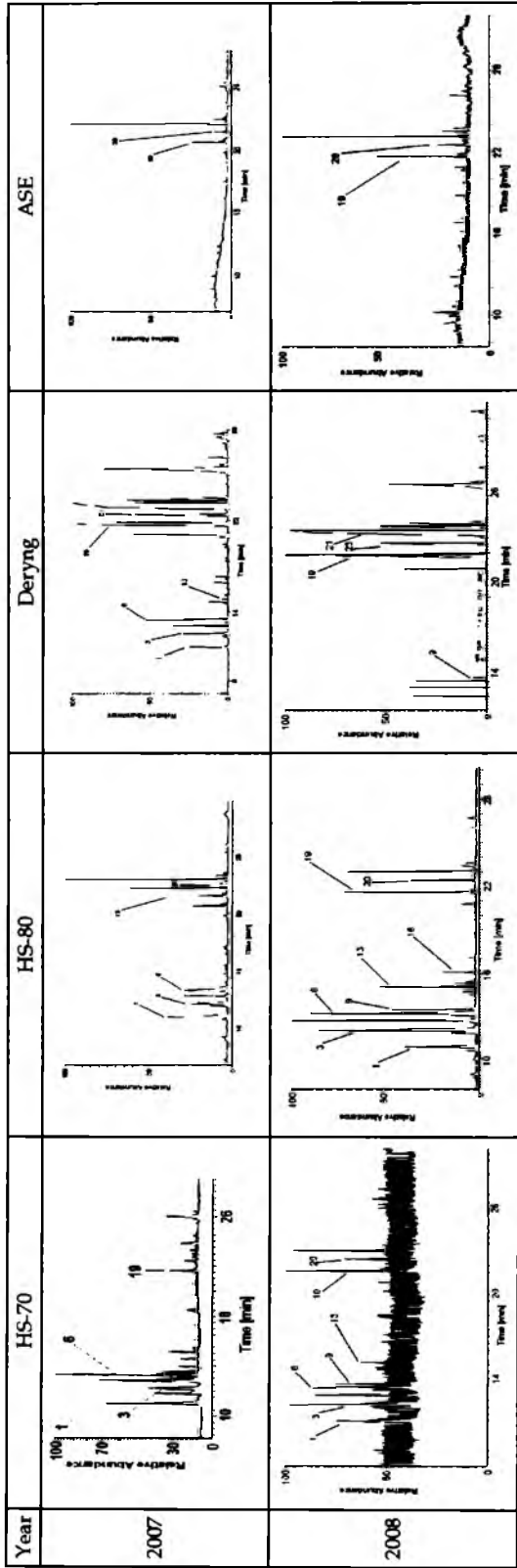


Fig. 2. Comparison of chromatograms showing volatile compounds extracted from *Salvia staminea* L. collected in 2007 and 2008 by use of: head-space extraction at 70°C (HS-70); head-space extraction at 80°C (HS-80); vapour distillation in a Deryng apparatus (Deryng) and accelerated solvent extraction (ASE). Numbering of the compounds conforms with that given in *Tables I–VI*

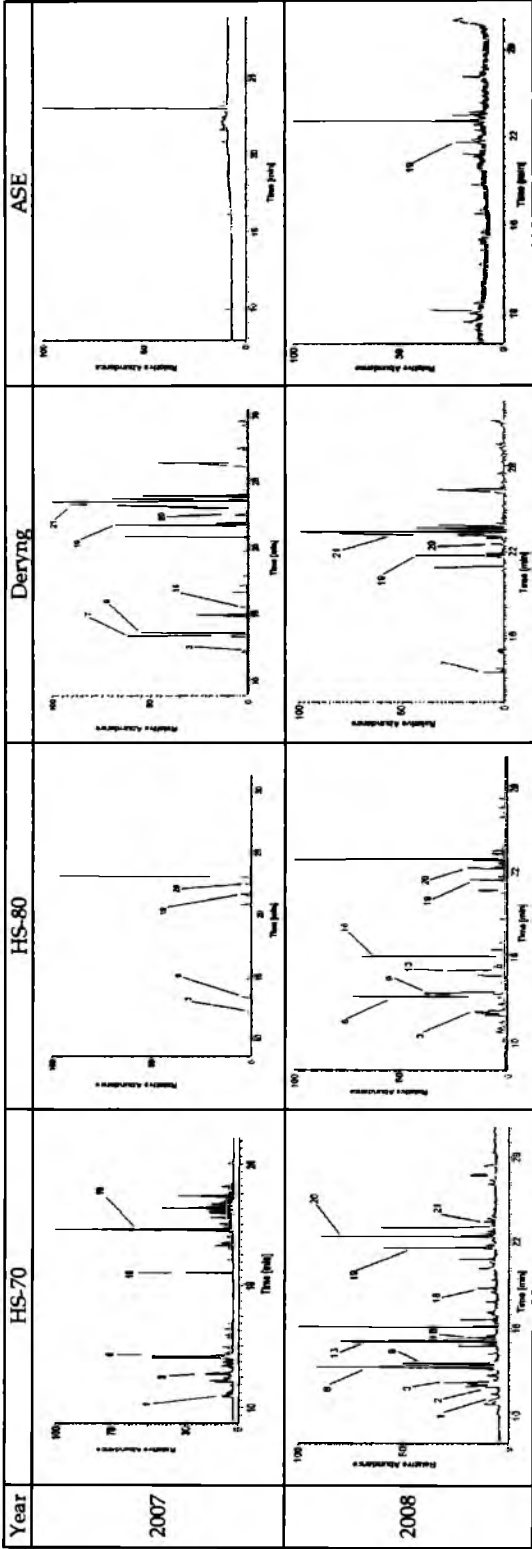


Fig. 3. Comparison of chromatograms showing volatile compounds extracted from *Salvia hians* L. collected in 2007 and 2008 by use of: head-space extraction at 70°C (HS-70); head-space extraction at 80°C (HS-80); vapour distillation in a Deryng apparatus (Deryng) and accelerated solvent extraction (ASE). Numbering of the compounds conforms with that given in Tables I–VI

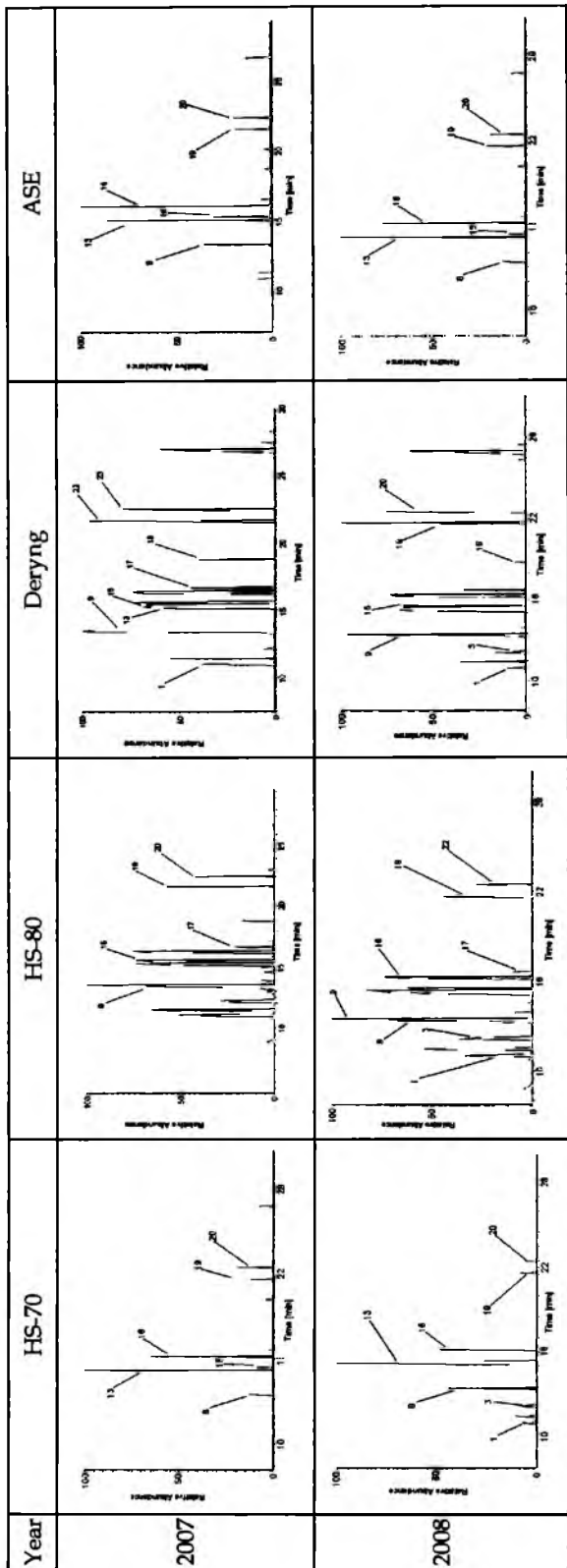


Fig. 4. Comparison of chromatograms showing volatile compounds extracted from *Salvia triloba* L. collected in 2007 and 2008 by use of: head-space extraction at 70°C (HS-70); head-space extraction at 80°C (HS-80); vapour distillation in a Deryng apparatus (Deryng) and accelerated solvent extraction (ASE). Numbering of the compounds conforms with that given in *Tables I–VI*



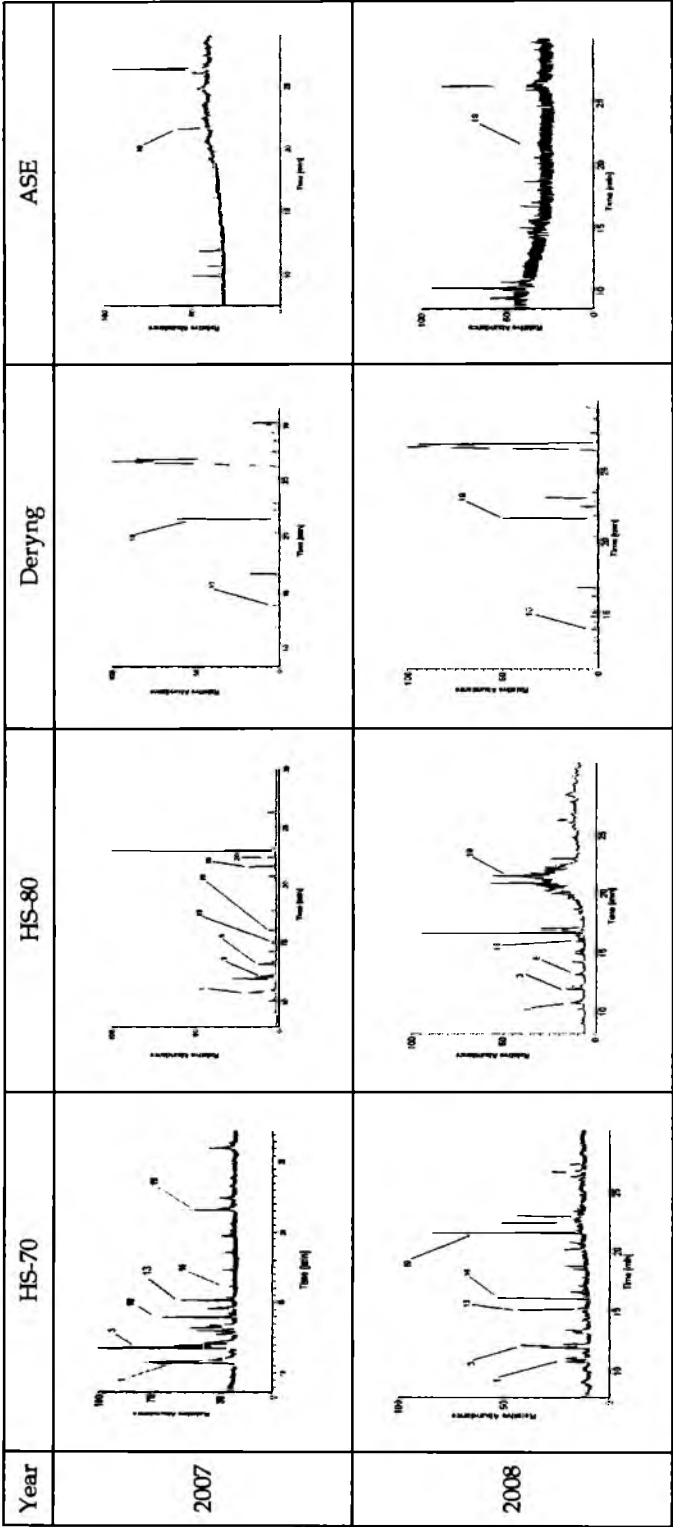


Fig. 5. Comparison of chromatograms showing volatile compounds extracted from *Salvia nemorosa* L. collected in 2007 and 2008 by use of: head-space extraction at 70°C (HS-70); head-space extraction at 80°C (HS-80); vapour distillation in a Deryng apparatus (Deryng) and accelerated solvent extraction (ASE). Numbering of the compounds conforms with that given in *Tables I–VI*

From this comparison it is apparent that for three of the five sage species investigated head-space extraction at 70°C yielded the largest numbers of volatile compounds (fourteen for *S. lavandulifolia* and eleven for *S. hians* and *S. nemorosa*). Head-space extraction at 70°C was also the most quantitatively efficient. Head-space extraction at 80°C was somewhat less efficient (yielding thirteen volatile compounds for *S. lavandulifolia*, five for *S. nemorosa*, and four for *S. hians*). Head-space extraction at 80°C also resulted in worse peak resolution than that at 70°C, which negatively affected both identification and quantitative comparison of the compounds. Vapour distillation in the Deryng apparatus yielded thirteen identified compounds for *S. staminea*, eleven for *S. lavandulifolia*, ten for *S. triloba*, seven for *S. hians*, and only two for *S. nemorosa*. Accelerated solvent extraction (ASE) with petroleum ether as extractant proved the least efficient, yielding six volatile compounds for *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, two for *S. staminea*, one for *S. nemorosa*, and none for *S. hians*. These results led to three observations:

- A temperature of 70°C was usually better suited to head space extraction than 80°C. Elevation of the temperature resulted in deterioration of the separation of the compounds, which negatively affected identification and quantitative comparison.
- All the extraction techniques except ASE with petroleum ether enabled efficient isolation of most of the volatile compounds from *S. lavandulifolia*.
- There is no doubt that ASE with petroleum ether can be applied only to plant material containing large amounts of volatile compounds.

Visual inspection of the chromatograms shown in Figs 1–5 also confirmed these observations.

Seasonal differences between the qualitative and quantitative composition of the volatile compounds from the five different sage species are apparent from the results given in Tables II–VI and Figs 1–5. The compounds identified in the volatile fractions obtained from the five species collected in 2007 and 2008 isolated from the crude plant material by means of the four different extraction techniques are listed in Tables II–VI, which also contain the percentage contributions of the respective peak heights for the identified volatile compounds to the sum of the peak heights for all the volatile compounds recorded. In these tables emboldening is used to indicate chemotaxonomic markers and chemotaxonomic advice compounds established for four of the sage species investigated in previous work [14].

Table II. Dependence on the method of extraction<sup>a</sup> of the relative amounts<sup>b</sup> of volatile compounds isolated from samples of *S. lavandulifolia* collected in 2007 and 2008. The retention times (*t<sub>R</sub>*) of the compounds are also given

Compound	<i>t<sub>R</sub></i> (min)	Peak height (%)									
		HS-70		HS-80		Deryng		ASE			
		2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		
<i>α</i> -Pinene	10.97	7.22	5.17	8.09	5.99	4.13	7.08	1.80	0.40		
Camphene	11.75										
<i>β</i> -Pinene	12.20	16.15	10.70	10.27	6.74	2.25	5.10	0.46	0.47		
<i>β</i> -Myrcene	12.25	<b>2.82</b>	<b>6.34</b>	<b>8.28</b>	<b>6.55</b>	<b>1.08</b>	<b>5.52</b>				
<i>o</i> -Cymene	13.15										
Limonene	13.26										
<i>β</i> -Phellandrene	13.32										
<i>β</i> -trans-Ocimene	13.36	++	12.92	++	12.04	12.70	14.97	13.44	9.41		
Eucalyptol	13.50	21.33	15.04	14.00	12.12						
<i>cis</i> -Ocimene	13.91	1.74		0.21	1.40	0.28	0.61				
<i>trans</i> -Terpinene	13.95										
<i>p</i> -Mentha-1,4-diene	14.59	0.09	0.54	0.06	1.40						
Thujol	15.12	2.47	2.23	9.67	9.32	9.22	10.80	7.52	19.85		
Thujenone	15.35										
Thujone	15.47	<b>13.08</b>	11.99	5.67	9.01	<b>2.88</b>	5.17				
Camphor	16.11	19.03	13.43	10.37	9.04	9.02	11.27	49.95	55.94		
Borneol	16.65	3.77	4.23	7.18							
Bornyl acetate	18.84	1.63	1.42	5.46	0.41	7.40	1.77				
<i>β</i> -Chamigrene	21.60	0.15	1.73	1.42		3.26	0.42	0.85	0.25		
Cadin-3,9-diene	22.43	1.02	3.76	4.33	1.70	7.64	8.17	3.30	3.73		
Murolene	23.31										
Isocaryophyllene	21.70										
Caryophyllene	22.53										

<sup>a</sup>HS-70, head-space extraction at 70°C; HS-80, head-space extraction at 80°C; Deryng, vapour distillation in a Deryng apparatus; ASE, accelerated solvent extraction

<sup>b</sup>The amount of a volatile compound extracted by a given method of extraction is expressed on the percentage scale (as semi-quantitatively estimated from its respective peak height relative to the sum for all the volatile compounds)

<sup>c</sup>Emboldening indicates the chemotaxonomic marker (*β*-myrcene) and chemotaxonomic advice compounds (*β*-trans-ocimene and thujone) established in previous work [14]

++ Detected, but not quantifiable

Table III. Dependence on the method of extraction<sup>a</sup> of the relative amounts<sup>b</sup> of volatile compounds isolated from samples of *S. staminea* collected in 2007 and 2008.  
The retention times ( $t_R$ ) of the compounds are also given

Compound	$t_R$ (min)	Peak height (%)							
		HS-70		HS-80		Deryng		ASE	
		2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
$\alpha$ -Pinene	10.97	10.09	3.72	8.75	5.28	2.64	6.36		
Camphene	11.75	4.86	1.44	2.47					
$\beta$ -Pinene	12.20	5.23	6.47	5.39	11.50	3.05	0.11		
$\beta$ -Myrcene	12.25								
<i>o</i> -Cymene	13.15								
Limonene	13.26	15.68	6.23	6.24	11.62	5.57	0.11		
$\beta$ -Phellandrene	13.32								
$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	13.36					3.93			
Eucalyptol	13.50	3.58	3.88	1.12	5.85	0.54	4.47		
<i>cis</i> -Ocimene	13.91	2.30		0.29					
$\tau$ -Terpinene	13.95								
<i>p</i> -Mentha-1,4-diene	14.59								
Thujol	15.12	3.33	2.51		7.01	0.41			
Thujenone	15.35	<b>0.69</b>	<b>1.64</b>		<b>1.49</b>	<b>0.30</b>			
Thujone	15.47								
Camphor	16.11								
Borneol	16.65					0.97			
Bornyl acetate	18.84								
$\beta$ -Chamigrene	21.60	2.98	6.44	8.39	9.38	10.21	12.08	13.17	12.11
Cadin-3,9-diene	22.43	1.41	3.49	2.19	4.60	6.30	6.39	4.70	3.90
Murolene	23.31								
Isocaryophyllene	21.70								
Caryophyllene	22.53								

<sup>a</sup>HS-70, head-space extraction at 70°C; HS-80, head-space extraction at 80°C; Deryng, vapour distillation in a Deryng apparatus; ASE, accelerated solvent extraction

<sup>b</sup>The amount of a volatile compound extracted by a given method of extraction is expressed on the percentage scale (as semi-quantitatively estimated from its respective peak height relative to the sum for all the volatile compounds)

<sup>c</sup>Emboldening indicates the chemotaxonomic advice compound (thujenone) established in previous work [14]

Table IV. Dependence on the method of extraction<sup>a</sup> of the relative amounts<sup>b</sup> of volatile compounds isolated from samples of *S. hians* collected in 2007 and 2008. The retention times ( $t_R$ ) of the compounds are also given

Compound	$t_R$ (min)	Peak height (%)							
		HS-70		HS-80		Deryng		ASE	
		2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
$\alpha$ -Pinene	10.97	1.26	0.63	0.21	0.75		8.95		
Camphene	11.75	2.67	1.95						
$\beta$ -Pinene	12.20	3.13	3.18	1.09	2.86	0.29			
$\beta$ -Myrcene	12.25								
<i>o</i> -Cymene	13.15								
Limonene	13.26	9.95	11.10	3.39	14.21				
$\beta$ -Phellandrene	13.32					8.93			
$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	13.36								
Eucalyptol	13.50	1.71	6.02	0.26	7.43	8.14			
<i>cis</i> -Ocimene	13.91								
$\tau$ -Terpinene	13.95	1.25	0.12						
<i>p</i> -Mentha-1,4-diene	14.59								
Thujol	15.12	0.98	9.12	0.38	5.44				
Thujenone	15.35								
Thujone	15.47	<b>0.50<sup>c</sup></b>	<b>0.59</b>	<b>0.29</b>	<b>0.85</b>	<b>0.54</b>	<b>0.04</b>		
Camphor	16.11		11.60	1.14	13.55				
Borneol	16.65								
Bornyl acetate	18.84	6.00	1.16	0.26	0.58				
$\beta$ -Chamigrene	21.60	22.05	8.52	3.72	3.28	9.80	8.26	2.55	3.46
Cadin-3,9-diene	22.43	2.61	10.16	1.71	3.58	1.50	1.22	1.20	1.31
Murolene	23.31	2.57	0.69	0.80	1.60	14.33			
Isocaryophyllene	21.70								
Caryophyllene	22.53								

<sup>a</sup>HS-70, head-space extraction at 70°C; HS-80, head-space extraction at 80°C; Deryng, vapour distillation in a Deryng apparatus; ASE, accelerated solvent extraction

<sup>b</sup>The amount of a volatile compound extracted by a given method of extraction is expressed on the percentage scale (as semi-quantitatively estimated from its respective peak height relative to the sum for all the volatile compounds)

<sup>c</sup>Emboldening indicates the chemotaxonomic advice compound (thujone) established in previous work [14]

Table V. Dependence on the method of extraction<sup>a</sup> of the relative amounts<sup>b</sup> of volatile compounds isolated from samples of *S. triloba* collected in 2007 and 2008. The retention times ( $t_R$ ) of the compounds are also given

Compound	$t_R$ (min)	Peak height (%)							
		HS-70		HS-80		Deryng		ASE	
		2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
$\alpha$ -Pinene	10.97	11.59	2.45	7.41	5.72	4.22	1.21		
Camphene	11.75								
$\beta$ -Pinene	12.20	0.28	2.04	4.23	6.28	0.47	0.93		
$\beta$ -Myrcene	12.25								
<i>o</i> -Cymene	13.15								
Limonene	13.26								
$\beta$ -Phellandrene	13.32			14.71					
$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	13.36							10.25	4.88
Eucalyptol	13.50	23.40	16.62		17.20	11.09	11.98		
<i>cis</i> -Ocimene	13.91								
$\tau$ -Terpinene	13.95								
<i>p</i> -Mentha-1,4-diene	14.59								
Thujol	15.12		36.23	11.05	14.28	7.41	8.22	24.92	38.41
Thujenone	15.35								
Thujone	15.47	<b>17.81<sup>c</sup></b>	<b>9.47</b>	<b>10.91</b>	<b>10.83</b>	<b>7.96</b>	<b>8.16</b>	<b>8.78</b>	<b>3.33</b>
Camphor	16.11	17.75	17.61	11.18	12.72	8.14		28.89	29.73
Borneol	16.65				1.65	4.89	4.21		
Bornyl acetate	18.84			2.52	0.27	4.38	0.69		
$\beta$ -Chamigrene	21.60	0.38	2.88	8.53	7.63	10.99	12.39	5.55	8.09
Cadin-3,9-diene	22.43	0.21	1.78	6.22	4.82	8.80	9.87	5.77	7.35
Murolene	23.31								
Isocaryo-phyllene	21.70								
Caryophyllene	22.53								

<sup>a</sup>HS-70, head-space extraction at 70°C; HS-80, head-space extraction at 80°C; Deryng, vapour distillation in a Deryng apparatus; ASE, accelerated solvent extraction

<sup>b</sup>The amount of a volatile compound extracted by a given method of extraction is expressed on the percentage scale (as semi-quantitatively estimated from its respective peak height relative to the sum for all the volatile compounds)

<sup>c</sup>Emboldening indicates the chemotaxonomic advice compound (thujone) established in previous work [14]

Table VI. Dependence on the method of extraction<sup>a</sup> of the relative amounts<sup>b</sup> of volatile compounds isolated from samples of *S. nemorosa* collected in 2007 and 2008.  
The retention times ( $t_R$ ) of the compounds are also given

Compound	$t_R$ (min)	Peak height (%)							
		HS-70		HS-80		Deryng		ASE	
		2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
$\alpha$ -Pinene	10.97	8.98	1.97	1.20	0.34				
Camphene	11.75	13.74							
$\beta$ -Pinene	12.20	2.20	5.28	3.57	1.31				
$\beta$ -Myrcene	12.25								
<i>o</i> -Cymene	13.15		1.04	4.22	1.30				
Limonene	13.26								
$\beta$ -Phellandrene	13.32								
$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	13.36								
Eucalyptol	13.50								
<i>cis</i> -Ocimene	13.91	7.44				1.15	0.61		
$\tau$ -Terpinene	13.95	++		0.68					
<i>p</i> -Mentha-1,4-diene	14.59	2.70	0.30	0.36					
Thujol	15.12	5.52	5.50	15.12	0.90				
Thujenone	15.35								
Thujone	15.47								
Camphor	16.11	1.23	7.18	1.74	0.64				
Borneol	16.65								
Bornyl acetate	18.84								
$\beta$ -Chamigrene	21.60	6.88	12.20	6.22	7.08	20.48	9.24	9.68	4.61
Cadin-3,9-diene	22.43	1.17	14.33	2.39	1.88				
Murolene	23.31		0.39						
Isocaryophyllene	21.70								
Caryophyllene	22.53								

<sup>a</sup>HS-70, head-space extraction at 70°C; HS-80, head-space extraction at 80°C; Deryng, vapour distillation in a Deryng apparatus; ASE, accelerated solvent extraction

<sup>b</sup>The amount of a volatile compound extracted by a given method of extraction is expressed on the percentage scale (as semi-quantitatively estimated from its respective peak height relative to the sum for all the volatile compounds)

++Detected, but not quantifiable

Basic qualitative features of the composition of the volatile fractions originating from sage species collected in 2007 and 2008 and isolated by use of the same experimental technique are quite similar, as is readily apparent from comparison of the chromatograms given in Figs 1–5. It should, however, also be added that the pairs of chromatograms for 2007 and 2008 are not identical, even though all the laboratory conditions were kept exactly the same. One important difference between the two sets of plant material is the different harvesting times (August 2007 and October 2008). Another factor certainly resulting in a difference is the unavoidable weather difference between the two growing seasons compared.

Analogous conclusions can be drawn from quantitative comparison of the seasonal yields of volatile compounds from the same sage species (Tables II–VI). Although these yields are often quite similar, the discrepancies – occasionally quite substantial – cannot be regarded as an exception either.

There is, however, one firm similarity between the volatile fractions obtained from the plants harvested in 2007 and 2008 – the consistent presence in (or absence from) the sage species of the components first described as chemotaxonomic marker and advice compounds [14]. Thus for *S. lavandulifolia*, in both growing seasons the presence of  $\beta$ -myrcene as chemotaxonomic marker and  $\beta$ -*trans*-ocimene and thujone as chemotaxonomic advice compounds was confirmed. With *S. staminea* the presence of thujenone, and with *S. hians* and *S. triloba* the presence of thujone as respective chemotaxonomic advice compounds was shown. With *S. nemorosa*, the absence of these compounds was also confirmed. It thus seems that chemotaxonomy of the sage species can be founded on the compounds in the volatile sage fraction with the confirmed property of repeatable chemotaxonomic markers and advice compounds.

## Conclusions

The following conclusions can be drawn from the results of this study:

- Most efficient isolation of the volatile constituents of the five different sage species was achieved by head-space gas chromatography at 70°C.
- Despite seasonal differences in the quantitative composition of the volatile compounds derived from the five different sage species harvested in the two different growing seasons, it seems that the consistent presence or absence of chemotaxonomic markers and advice compounds in some sage species can be regarded as useful for chemotaxonomic purposes with these particular species.



- Finally, it seems that more detailed analysis of the abundant information contained in the discussed fingerprints of the volatile compounds can only be extracted with aid of the adequate chemometric methods.

## Acknowledgement

The work of one author (Ł.W.) was partially supported by PhD scholarship granted to him in 2008 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

## References

- [1] K. Skalicka-Woźniak, J. Widelski, and K. Głowniak, in: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, and T. Kowalska (eds) *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC Press, Boca Raton, USA, 2008, Chapter 2
- [2] M. Rajani and N.S. Kanaki, in: K.G. Ramawat and J.M. Mérillon (eds) *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, Springer, Berlin, 2008, Chapter 19
- [3] B. Daviss, *The Scientist*, **19**, 25–28 (2005)
- [4] S.G. Oliver, M.K. Winson, D.B. Kell, and F. Baganz, *Trends Biotechnol.*, **16**, 373–378 (1998)
- [5] J.K. Nicholson, J. Lindon, and E. Holmes, *Xenobiotica*, **29**, 1181–1189 (1999)
- [6] O.A. Mamer, *Biol. Mass Spectrom.*, **23**, 535–539 (1994)
- [7] O. Fiehn, *Plant Mol. Biol.*, **48**, 155–171 (2002)
- [8] R. Goodacre, S. Vaidyanathan, W.B. Dunn, G.G. Harrigan, and D.B. Kell, *Trends Biotechnol.*, **22**, 245–252 (2004)
- [9] C. Birkemeyer, A. Luedemann, C. Wagner, A. Erban, and J. Kopka, *Trends Biotechnol.*, **23**, 28–33 (2005)
- [10] S.B. Chen, H.P. Liu, R.T. Tian, D.J. Yang, S.L. Chen, H.X. Xu, A.S.C. Chan, and P.S. Xie, *J. Chromatogr. A*, **1112**, 114–119 (2006)
- [11] X.H. Fan, Y.Y. Cheng, Z.L. Ye, R.C. Lin, and Z.Z., Qian, *Anal. Chim. Acta*, **555**, 217–224 (2006)
- [12] *Polish Pharmacopoeia VI*, Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, 2002
- [13] *Extraction of Oils from Oilseeds by Accelerated Solvent Extraction*, Application Note 325, Dionex, Sunnyvale, CA, USA
- [14] J. Rzepa, Ł. Wojtał, D. Staszek, G. Grygierczyk, K. Labe, M. Hajnos, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. Sci.*, 2009, in press

Accepted by TK

Original Research Papers

## Comparative Analysis of the Chromatographic Fingerprints of Twenty Different Sage (*Salvia* L.) Species

M. DASZYKOWSKI<sup>1</sup>, M. SAJEWICZ<sup>2</sup>, J. RZEPA<sup>2</sup>, M. HAJNOS<sup>3</sup>, D. STASZEK<sup>2</sup>,  
Ł. WOJTAL<sup>2</sup>, T. KOWALSKA<sup>2</sup>, M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS<sup>4</sup>, AND  
B. WALCZAK<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemometrics, Institute of Chemistry, Silesian University,  
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

<sup>2</sup>Department of General Chemistry and Chromatography, Silesian University,  
9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

<sup>3</sup>Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin,  
1 Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

<sup>4</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin,  
6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland

E-mail: beata@us.edu.pl

**Summary.** Comparative analysis of twenty different sage (*Salvia* L.) species grown in Poland has been performed on the basis of two types of chromatographic fingerprints. For efficient preprocessing and comparison of these fingerprints, chemometric methods were used. The main emphasis was on preprocessing of herbal fingerprints and selecting a suitable preprocessing strategy for exploring differences among them. After successful preprocessing of the fingerprints, principal component analysis was used to reveal chemical differences among the samples. An outcome of the comparative analysis was to pinpoint specific regions of the fingerprints indicative of differences among the samples. In fingerprints of the volatile fraction from the sage (*Salvia* L.) species, obtained from head-space gas chromatography coupled with mass spectrometry, important regions were identified and associated with the presence of camphene, limonene, and eucalyptol in these samples.

**Key Words:** background removal, chemometrics, comparative analysis, denoising, signal processing, sage (*Salvia* L.) species, HPLC fingerprints, HS-GC-MS fingerprints

## Introduction

The genus *Salvia* is recognized around the world for having commercial, medicinal and cultural importance, mainly because of the useful essential oils produced by *Salvia* foliage [1, 2]. Several *Salvia* species have been cultivated as ornamental plants, or for their aromatic and aromatherapeutic properties, for confectionery, and as culinary herbs [3]. About thirty *Salvia* species grow naturally or are cultivated in Poland [4]. Medicinal applica-

tions of *Salvia* herbs are diverse, because of the different pharmacological activity of the species. Some are used as alimentary tract stimulators and digestion regulators, with additional antiseptic properties. Other *Salvia* species are known for their antipyretic, analgesic, and expectorant properties, and are readily applied in therapy of influenza and colds. Yet other species are used in therapy of psychoses, depression, and neuroses, because of the sedative properties of the respective decoctions. Application of sage against menstruation disorders has also been reported [5].

There has recently been substantial growth of interest in characterization of the chemical contents of a sample by use of its analytical signal, which is regarded as a sample fingerprint [6]. The use of fingerprinting strategies and methods is steadily attracting attention, e.g. for quality control of herbal medicines [6], in the petroleum industry [7], in biotechnology for peptide mapping [8, 9], or in tracing the origin of some products [10]. Among the different analytical techniques well suited to fingerprinting, chromatographic methods have their special place, because they enable separation and quantification of the components of the mixtures analyzed. For very complex samples (like those of natural origin), chromatograms (fingerprints) are often used for characterization and comparison, because of the high cost or the lack of chromatographic standards.

The task of comparative analysis of the samples represented by their chromatographic fingerprints can largely be facilitated by use of a variety of chemometric techniques, which include approaches that help to preprocess the chromatographic data [11], evaluate differences among the samples [12], estimate the number of components in a sample [13, 14], and visualize multivariate data [15].

For most applications, before further chemometric analysis, chromatographic fingerprints require some preprocessing to take their potential deficiencies into account. This step is very important, because it can hamper reaching overall conclusions about differences among the samples. Preprocessing of chromatographic fingerprints is a very challenging task and great care should be taken when a few preprocessing methods are used sequentially. Depending on the type of the sample and the technique selected, the fingerprints obtained contain different information. Therefore, preprocessing methods applied to chromatographic fingerprints ought to emphasize the underlying differences among the samples related to their chemical composition only, suppress undesired instrumental variations, and enhance the signal-to-noise ratio of the individual fingerprints.

In this paper, we focus on aspects of preprocessing of the chromatographic fingerprints of the twenty different sage (*Salvia* L.) species and on their comparative analysis. The comparative analysis is performed for two sets of fingerprints. The first set of fingerprints was obtained by use of high-

performance liquid chromatography (HPLC), the second by use of head-space gas chromatography with mass spectrometric detection (HS-GS-MS). It is revealed that – depending on the quality of the fingerprints – they may require different preprocessing (e.g., baseline correction, denoising, signal alignment, etc.). For preprocessing and comparative analysis, the optimum set of chemometric approaches was selected and used.

## Theory

In this section, we provide a short description of methods suitable for preprocessing and comparative analysis of chromatographic fingerprints. Fingerprints usually require background and noise removal, and peak alignment before comparative analysis.

### Background Elimination

Many different approaches can be used to remove the background component from analytical signals; these include the penalized asymmetric least-squares, PALS, approach proposed by Eilers [16]. It is an iterative procedure, in which a signal baseline,  $\mathbf{b}$ , is fitted to the signal,  $\mathbf{x}$ , in a least-squares sense. The key assumption is that each point of a signal has a different weight. In the course of procedure, these weights are modified so that the points above an approximated baseline receive very small weights, and otherwise the weights are close to 1. The objective function,  $Q$ , minimized during the iterative procedure, can be expressed as:

$$Q = \sum_{i=1}^n w_i (x_i - b_i)^2 + \lambda (\Delta^d b_i)^2 \quad (1)$$

where  $w_i$  are weights,  $\lambda$  is the so-called penalty term,  $d$  denotes the order of differences  $\Delta$ , and  $n$  is the number of sampling points in a signal.

Two input quantities should be optimized – the order of differences and the penalty term. In most applications satisfactory baseline approximations are obtained when  $d = 2$ . The penalty term, which weighs the second term of eq. (1), is intended to control the smoothness of the signal baseline. The larger the values of  $\lambda$ , the smoother the baseline obtained.

## Elimination of Noise from Analytical Signals

To suppress white (Gaussian) noise in analytical signals, different types of digital filters can be used either in time or in the frequency domain [17, 18], e.g., moving-average, Savitsky-Golay filters, etc. Recently, denoising of chromatographic signals by use of wavelets has attracted much attention, because this approach can efficiently deal with white noise in non-stationary signals [19–21]. Chromatograms are typical examples of such instrumental signals, because they contain components of very different frequencies.

The wavelet transform operates on a single analytical signal,  $\mathbf{x}$ , and it linearly transforms this signal from its original domain to the wavelet domain. Wavelets are a set of specific functions or basis vectors with orthogonal and local properties. For this reason wavelets have much potential to model different signal components and enable a signal to be studied at its different resolution levels. In the wavelet domain, each signal is described by a set of the so-called wavelet coefficients,  $\mathbf{c}$ :

$$\mathbf{c} = \mathbf{W}^T \mathbf{x} \quad (2)$$

where  $\mathbf{W}$  is a matrix that contains the basis vectors in columns, and  $\mathbf{x}$  is an analytical signal.

Processing of instrumental signals in the wavelets domain can be computationally very efficient when the so-called pyramid algorithm is used. However, this algorithm can only deal with signals of length equal to an integer power of two [22]. Several approaches can be used to adjust signals to a desired length. The signals are then decomposed in several consecutive steps. The time domain of a signal is recursively cut into halves using a low-pass filter and a high-pass filter until only one point remains in the processed signal [23]. At each decomposition level, two sets of wavelet coefficients are obtained, i.e.  $n/2$  of the low-frequency coefficients (the so-called approximations) and  $n/2$  of the high-frequency coefficients (the so-called details). Details obtained from the first level decomposition of a signal can support estimation of its noise level. For this purpose, two available thresholding policies (soft and hard) and several threshold criteria can be used. On this basis it is possible to determine and eliminate the details representing signal noise [21]. After removal of these details, the signal is transformed back in the time domain, eventually resulting in a noise-free signal.

### Alignment of Instrumental Signals

Before chemometric analysis, chromatographic signals must usually be aligned [24]. Chromatographic techniques, especially high-performance liquid chromatography (HPLC), are vulnerable to different sources of instrumental variations, usually caused by column ageing phenomena, changes in mobile phase composition, difficulties in reproducing the same gradient conditions and the same temperature in the course of analysis, etc. Such difficulties are often encountered, when a large-scale experiment is launched, and analysis of samples is performed over a long period of time. This can result in peak shifts along the time axis, and thus when pairs of chromatograms are compared, peaks of the same component do not match. To overcome the peak-shift problem, many alignment techniques have been proposed [16, 25–30]. Their objective is to match corresponding peaks across a set of chromatograms. Alignment of instrumental signals is not a trivial task, because correspondence of peaks is unknown. Otherwise, one could relatively easily match the peaks between the corresponding points in the pairs of signals (a target and a signal being aligned) by means of linear interpolation. As shown in the literature, correlation optimized warping (COW) [25] seems a frequent method of choice in a variety of alignment applications. Practically, COW has a very appealing feature – no assumptions about the signals are required. Using the COW method, peaks in a signal,  $P$ , are matched with their counterparts in the target signal,  $T$ . To accomplish the alignment, piecewise linear stretching and compression of signal  $P$  is performed so that the correlation coefficient between signals  $P$  and  $T$  is maximized. In the COW approach, two input variables, the section length,  $N$ , and the so-called slack variable, denoted  $t$ , control the quality of the alignment. Initially, chromatograms  $P$  and  $T$  are divided into  $N$  sections, each with its start and end points. Sections in signal  $P$  are then warped by changing the positions of the end points. When  $t = 1$ , each end point of a section can have three possible locations:  $[-1, 0, 1]$ . This notation means, respectively, that a given section is shortened by one point, the section length remains unchanged, and the section is made one point longer. A detailed presentation of the COW algorithm can be found elsewhere [25].

### Principal Component Analysis

The objective of principal component analysis is to represent the structure of data using a set of a few new variables called principal components, PCs [31]. They are linear combinations of the original data variables that maximize description of data variance. Principal components are orthogo-

nal vectors, and thus each consecutive PC models a part of the information not explained by its predecessors. The PCA model with  $f$  principal components, constructed for any data matrix  $X(m \times n)$ , can be represented as:

$$X = TP^T + E \quad (3)$$

where  $T(m \times f)$  is the matrix of scores,  $P(n \times f)$  is the matrix of loadings,  $E(m \times n)$  is the residual matrix, containing information that was not modelled using the PCA model with  $f$  principal components, and superscript  $T$  denotes transposition of the matrix.

In the course of running PCA, the original data are decomposed into a set of scores and loadings which can be used to visualize and interpret the data structure. Therefore, the set of scores and loadings can also be regarded as a new coordinate system. The score plots (constructed as projections of samples on to the plane defined by selected pairs of PCs) enables study of similarities among the samples, whereas the loading plots (representing the projections of the variables on the planes of selected PCs) give information about contribution of individual data variables to a given PC. When two samples are similar chemically, they are also close to each other on the score plot. High similarity between two experimental variables is manifested on a loading plot by a small angle between the two vectors of weights. Their starting points are located at the origin of a principal components system whereas their end points are defined by the corresponding weight values for a selected pair of PCs.

## Experimental

### Plant Material

Samples of the twenty different sage (*Salvia* L.) species investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, in August, 2007. Botany specialists identified each species and voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University, Lublin. The sage species investigated are listed in Table I. Plant material was dried at 35 to 40°C for 40 h in an oven with forced air flow and the dry material obtained was stored under refrigeration until required for analysis.

Table I. The sage (*Salvia* L.) species investigated

No.	Name
1	<i>S. azurea</i>
2	<i>S. lavandulifolia</i>
3	<i>S. verticillata</i>
4	<i>S. pratensis</i>
5	<i>S. staminea</i>
6	<i>S. deserta</i>
7	<i>S. cadmica</i>
8	<i>S. forskahlei</i>
9	<i>S. sclarea</i>
10	<i>S. canariensis</i>
11	<i>S. hians</i>
12	<i>S. triloba</i>
13	<i>S. glutinosa</i>
14	<i>S. nemorosa</i>
15	<i>S. tesquicola</i>
16	<i>S. amplexicaulis</i>
17	<i>S. atropatana</i>
18	<i>S. stepposa</i>
19	<i>S. jurisicii</i>
20	<i>S. officinalis</i>

Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Compounds of interest (flavonoids and phenolic acids) were extracted from the plant material by use of Dionex (Sunnyvale, CA, USA) ASE 200 equipment. Each sage species (5 g) was weighed, powdered in a porcelain mortar, and placed in the cell of the accelerated solvent extraction (ASE) unit. We used a two-step extraction procedure. In the first step, sage samples were extracted for 20 min with *n*-hexane at 40°C, to remove chlorophyll from the foliage, and the *n*-hexane extract was discarded. In the second step, the same sage samples were extracted for 12 min with methanol at 100°C. Both extraction steps were performed at a pressure of 65 atm.

Each extract was evaporated to dryness in a stream of air, then 5 mL methanol was added to the dry residue and the mixture was ultrasonicated for 15 min in a model RK 255H Sonorex Super ultrasonication bath (Bandelin, Berlin, Germany). Finally, the contents of each vial were concentrated to 1 mL by evaporation of excess methanol. Extracts were filtered through an Anotop syringe filter with aluminium oxide adsorbent (Merck #11320) and the samples were ready for liquid chromatographic analysis. The amount analysed was 40 µL.



### High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection (HPLC-DAD)

HPLC was performed with a Gyncotek (Macclesfield, UK) liquid chromatograph equipped with the Gyncotek Gina 50 autosampler, the Gyncotek P 580A LPG pump, the Gyncotek UVD 340U diode-array detector (DAD), and Chromeleon Dionex v. 6.4 software for data acquisition and processing. Compounds were separated on a 250 mm  $\times$  4.6 mm i.d., 5- $\mu$ m particle, RP-18 column (Varian, Harbor City, CA, USA; #1215-9307) with acetonitrile-water 55:45 (*v/v*), containing a trace amount of glacial acetic acid, as isocratic mobile phase. The flow rate was 0.6 mL min<sup>-1</sup>. The quantitative composition of the mobile phase was specially developed for the purpose of this analysis).

Development of the ASE procedure used for plant extraction followed by HPLC-DAD acquisition of the sage fingerprints has been described in detail elsewhere [32].

### Head-Space Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection (HS-GC-MS)

Each sage species (1 g) was weighed, powdered in a porcelain mortar, and placed in a 10-mL glass vial stoppered with a Teflon-faced silicone rubber septum. Three replicates of each sample were processed identically. HS-GC-MS analysis was performed with a Trace 2000 gas chromatograph, an MS Trace mass detector (both from ThermoQuest, Waltham, MA, USA), and a CTC Analytics autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland), used in the head-space mode. Temperature and time of head-space desorption were, respectively, 70°C and 15 min. The head-space phase (0.5 mL) was introduced into a 30 m  $\times$  0.25 mm i.d. capillary column coated with a 0.25- $\mu$ m film of DB-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA; formerly J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium (*p* = 100 kPa) was used as carrier gas. The column temperature was maintained at 40°C for 3 min, then programmed at 8° min<sup>-1</sup> to 150°C, which was maintained for 15 min. The injector temperature was 150°C.

The mass spectrometer was fitted with an EI source operated at 70 eV. Identification of individual compounds was based on comparison of mass spectra obtained from sample components with those from standards or available from the NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) software library. Retention times of peaks from the *Salvia* samples were also compared with those of known components of other essential oils. For this purpose we used pine oil, peppermint oil, euca-

lyptus oil, and juniper oil (Apotheca Pacis, Rybnik, Poland) as the sets of the volatile standards [33].

## Results and Discussion

In our study, two sets of herbal fingerprints of the *Salvia* species were processed and compared using chemometric methods. Chemometrics has many approaches that can be used to explore and to evaluate differences among chromatographic fingerprints. Irrespective of the method used, proper signal preprocessing is crucial for the further comparative and exploratory analysis. Preprocessing of instrumental signals is performed to meet three objectives:

- (i) to enhance signal quality;
- (ii) to make the signal analysis possible; and
- (iii) to enhance interpretation of the final results.

These objectives are usually accomplished in four consecutive steps of signal preprocessing and in the next sections they are discussed in detail.

### Step 1: Preliminary Preparation of Chromatographic Fingerprints

The first step of signal preprocessing can be regarded as a preliminary step. At this stage, individual fingerprints are prepared to make further preprocessing possible. For example, adjustment of the length of the chromatograms and/or removal of uninformative parts can prove necessary; this was necessary for the herbal fingerprints studied in this work.

With the analyzed HPLC fingerprints, different acquisition rates were used from one sample to another. In that way, peaks were better shaped but the time axis of the chromatograms is not uniformly sampled. As a consequence, within each time interval the number of the data points is different. The length of the analyzed HPLC chromatograms varied between 4380 and 10 859 sampling points. To organize these data into a matrix, it is obligatory to record all chromatograms within the same time interval and sample their time axis at the same points. To take uneven sampling of the time axis into account, signal intensities measured at the points of the original time axis can be linearly interpolated to the points of a new time axis that are uniformly distributed over the entire time range; this was done for the HPLC fingerprints studied.

To illustrate this, Fig. 1a shows the original chromatogram of sample 12 (extract of *S. triloba*), divided into twenty time intervals of 4 min each. In each time section, the number of the sampling points was determined and is visualized in Fig. 1b.

From this figure, it can easily be understood that each section consists of a different number of sampling points. In terms of the number of points, the width of individual sections can be relatively large, and range from 110 to 2048 sampling points. As shown in Fig. 1c, linear interpolation enables adjustment of the acquisition rate and, finally, each section has the same number of sampling points.

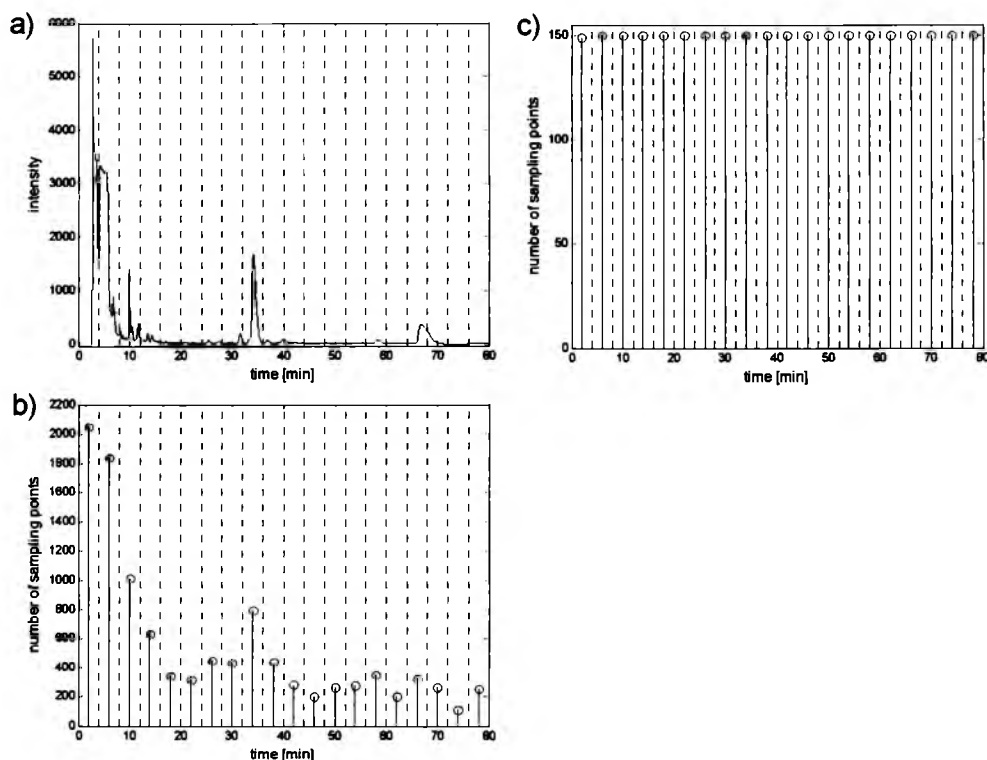


Fig. 1. (a) Original HPLC chromatogram of sample 12 (extract of *S. triloba*) divided into twenty time sections of 4 min each; (b) number of sampling points in each time window; (c) number of points in each time window after linear interpolation of a signal to a length of 3000 sampling points

Moreover, linear interpolation preserves the peak shapes. It seems the best option to adjust the number of points on the new time axis in accordance with the shortest chromatogram. Linear interpolation can also be used to reduce the length of a chromatogram. Very often, the number of the data points in a chromatogram can be much reduced, virtually without any

loss of its information content, thus considerably reducing the computational effort necessary to preprocess the signals. Such a signal preprocessing is, therefore, frequently used before signal alignment, for instance using the COW algorithm [25]. On the other hand, when chromatograms require denoising, linear interpolation to adjust their lengths cannot be used, because this operation affects noise characteristics.

Coming back to processing our collection of the HPLC fingerprints, it is relevant to stress that all have a satisfactory signal-to-noise ratio. Therefore, noise elimination proved unnecessary, yet the fingerprints were of different length. Bearing in mind a satisfactory signal-to-noise ratio, fingerprint lengths were adjusted using linear interpolation. After this transformation, the longest chromatogram (chromatogram 12; extract of *S. triloba*) was compressed by a factor of approximately 3.6 (from 10 859 to 3000 sampling points). As shown in Fig. 2b, important signal details relevant to the problem studied were still present after compression.

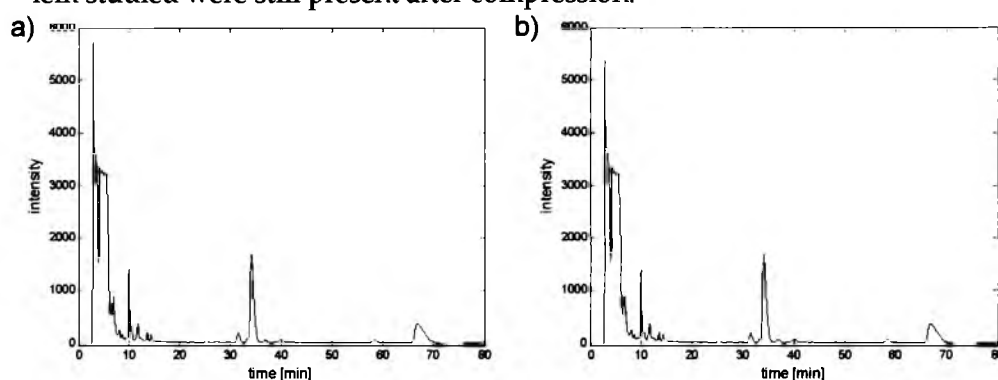


Fig. 2. HPLC chromatogram obtained from *S. triloba* extract (sample 12) before (a) and after (b) linear interpolation reducing the number of sampling points from 10 859 to 3000

The objective of another type of initial fingerprint preprocessing is to remove uninformative regions from the signals. For example, peaks that are not expected to explain variability among the samples should be removed. An uninformative region between 0 and 8.5 min, where the predominant signals were from carbon dioxide and oxygen, was therefore removed from all HS-GC-MS fingerprints.

### Step 2: Enhancement of Signal-to-Noise Ratio for Chromatographic Fingerprints

In the second preprocessing step, we concentrated on enhancement of the signal-to-noise ratio of the herbal fingerprints. To remove the background from these fingerprints and to suppress noise, the penalized asymmetric

least-squares (PALS) method and the wavelet transform, respectively, were used. Except for signal 10, the penalty term used for all the HS-GC-MS fingerprints in the PALS method was set to  $10^5$ . For signal 10 it was  $10^3$ . As an illustration of background removal using the PALS method, first let us consider the HS-GC-MS fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea*, shown in Fig. 3a.

It is apparent that the fingerprint obtained requires offset and background corrections, because these two components substantially contribute to the overall signal intensity. Fig. 3b shows the chromatographic fingerprint of *S. azurea* without the offset and background, and Fig. 3c shows the estimated background profile, obtained by use of the PALS method. Background elimination was necessary for all the chromatographic fingerprints studied, but only for the HS-GC-MS fingerprints was the noise level substantial. Therefore, these fingerprints were further preprocessed using the wavelet transform, implemented in MATLAB and freely available from Ref. [34]. The wavelet basis and decomposition level were optimized. The symmelet wavelet (with five vanishing points) was applied as a mother

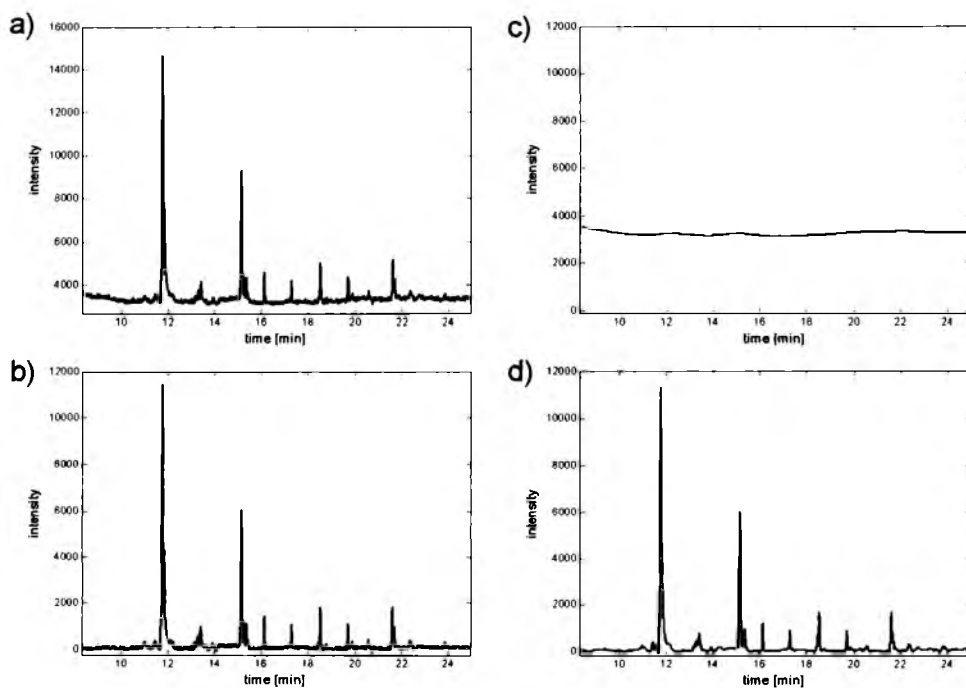


Fig. 3. (a) Original HS-GC-MS fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea*.  
(b) The same fingerprint after removal of its background component.  
(c) The estimated background profile using the penalized asymmetric least-squares method. (d) Fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea* after background elimination and noise reduction using the wavelet transform

wavelet, and the decomposition level was set to two. To remove irrelevant details, the 'Visu' criterion and the soft thresholding policy were used. Fig. 3d shows the HS-GC-MS fingerprint of the volatile fraction of *S. azurea* after denoising by use of the wavelet transform.

### Step 3: Alignment of Chromatographic Signals

The HPLC fingerprints obtained from the extracts of *S. azurea* and *S. sclarea*, shown in Fig. 4a, illustrate the peak-shift problem in HPLC data. The same is true for the HS-GC-MS fingerprints, so both sets of fingerprints require alignment. These sets were aligned by use of the COW method, implemented in the freely available MATLAB toolbox [35]. Initially, for each fingerprint type, the target signal was selected on the basis of the correlation coefficient criterion. As target signal, that with the highest mean correlation coefficient among all the considered signals was selected [36] and further used to align the remaining signals. Then, for each group of fingerprints, warping variables were optimized. With the HPLC fingerprints, each signal was divided into 120 sections and the slack variable was set to 5. With the HS-GC-MS fingerprints, the optimum alignment was obtained when signals were divided into 90 sections and the slack variable was set to 5.

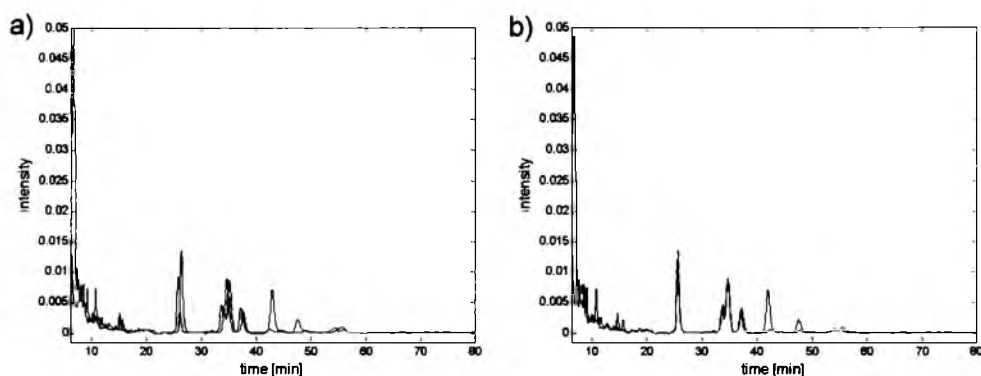


Fig. 4. Two superimposed HPLC fingerprints of samples 1 and 9 (extracts of *S. azurea* and *S. sclarea*.) before (a) and after (b) their alignment using the correlation optimized warping

To demonstrate the effect of signal alignment, let us consider the pair of chromatographic fingerprints shown in Fig. 4a. Although the samples of the herbal extracts studied tended to differ substantially in their chemical composition, from Fig. 4b it is evident that, using the COW method, two fingerprints were aligned satisfactorily.

### Step 4: Normalization

To take other deficiencies of the assessed herbal fingerprints into account, the last step of preprocessing was executed and the additional data transformations were applied. For chromatographic signals similar to those discussed in this paper, different types of normalization can be considered. Probably the most frequently applied transformation is simple normalization of individual signals that enables correction of differences between injected sample volumes. This type of preprocessing was applied to both sets of sage fingerprints. In addition to simple normalization, other types of normalization exist, e.g. scaling each signal to the largest peak observed in a signal or among all signals, the so-called Pareto scaling, vast scaling, etc. [37, 38].

To emphasize variability related to the variation among the sage fingerprints, they were also centred before comparative analysis. In that way, constant terms are removed from the data and data variability is set about its mean.

A comprehensive overview of different data preprocessing approaches can be found elsewhere [37], and a detailed discussion is also given in Ref. [39], and in the references contained therein.

### Exploratory Analysis of the Sage (*Salvia* L.) Fingerprints Investigated

After preprocessing of the fingerprints (removal of uninformative regions from the chromatograms, elimination of the background and noise components, alignment of the fingerprints, and normalization), it is possible to explore differences among the samples. When data preprocessing is performed carefully, the undesired part of the data variation is removed. Comparative analysis of the samples can now be focused solely on the informative part of the data related to chemical variability among the samples.

Many chemometric techniques are suitable for exploration of differences among samples. In our study, principal component analysis (PCA) was used to study differences among the chromatographic fingerprints of the sage species.

The HS-GC-MS fingerprints represent the chemical contents of the volatile fraction of *Salvia* species. The first two principal components describe ca 46.6% of the total data variance. Data compression is not very efficient, and the score plot presented in Fig. 5 reveals an inhomogeneous data structure. It is possible to distinguish three groups of the samples. The first group contains nine samples (1, 3, 4, 9, 10, 12, 14, 15, and 18), the second

group contains eight samples (2, 5, 6–8, 16, 17, and 19), and the third group contains samples 11, 13, and 20. The numbers of the sage species discussed in this study are listed in Table 1.

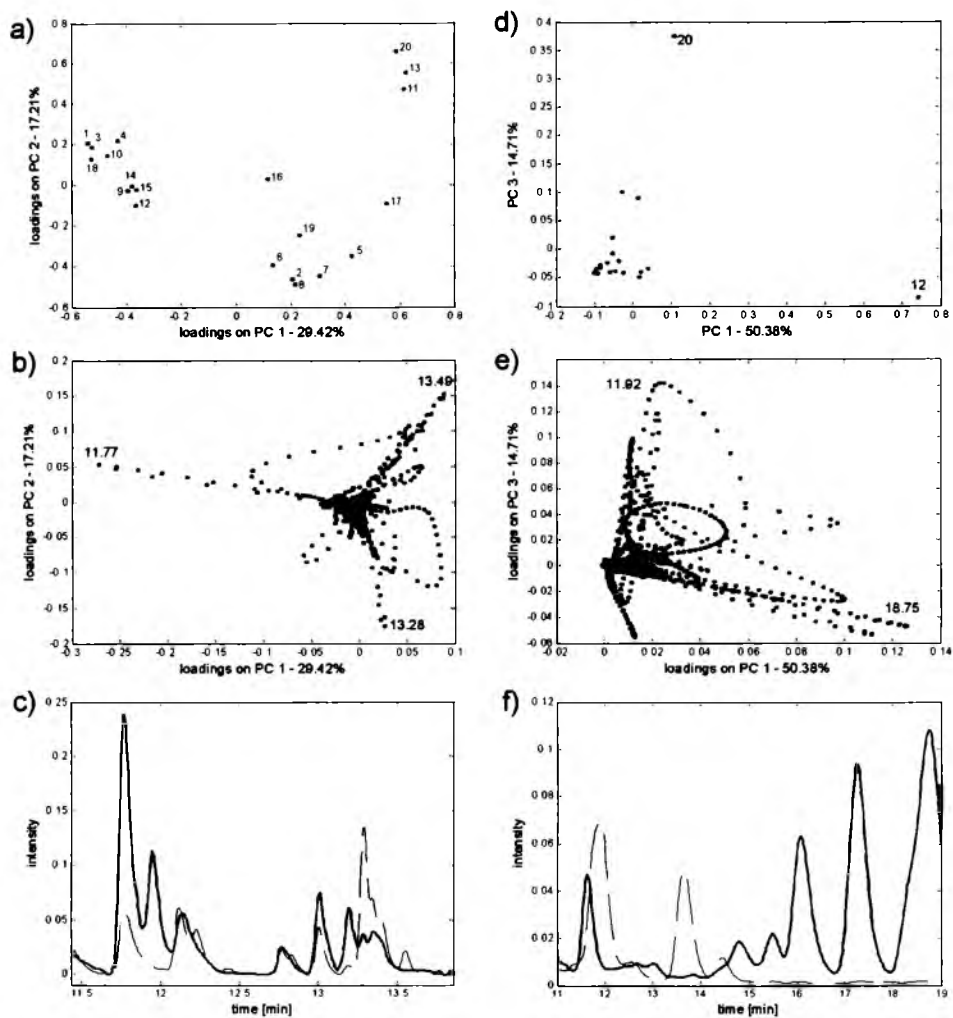


Fig. 5. (a) The PC1-PC2 score plot for the HS-GC-MS fingerprints. (b) Projection of the loadings on the space of the first two principal components. (c) Superimposed HS-GC-MS chromatograms from sage species 7 (dashed line, *S. cadmica*) and 14 (solid line, *S. nemorosa*), for which chemical differences were identified by use of PCA. (d) PC1-PC3 score plot for the HPLC fingerprints. (e) Projection of the corresponding loadings on the space of the first and third principal components. (f) Superimposed HPLC chromatograms from sage species 13 (solid line, *S. glutinosa*) and 20 (solid line, *S. officinalis*), for which chemical differences were identified by use of PCA



To interpret differences among the groups of sage samples, score and loading plots are interpreted simultaneously. The largest contribution to the first PC (PC1) is the peak of retention time,  $t_R$  11.77 min; the largest to the second PC (PC2) are the peaks of  $t_R$  13.28 and 13.49 min. We have previously shown that these peaks are those of camphene, limonene, and eucalyptol, respectively [40]. Samples from the first group have a relatively large peak at 11.77 min compared with samples from the other groups and, hence, these particular samples are relatively rich in camphene. Samples from the second group are characterized by medium amounts of camphene and very low amounts of limonene and eucalyptol. The unique properties of the samples from the third group can be explained by the loading values on PC2. For these particular samples, peaks with  $t_R$  13.49 min (high intensity) and 11.77 and 13.28 min (both of low intensity) seem significant. These samples contain relatively small amounts of camphene and limonene, but larger amounts of eucalyptol. Fig. 5c shows a selected time region for two superimposed chromatograms, those from samples 7 (dashed line, *S. cadmica*) and 14 (solid line, *S. nemorosa*), for which chemical differences were identified by use of PCA. Chemical differences between the two groups of fingerprints are mostly quantitative in nature.

For the HPLC fingerprints, compression by means of PCA was quite effective, with the first two PCs explaining over 72% of the total data variance. The most interesting pattern of samples is revealed on the PC1-PC3 score plot (Fig. 5d). Two samples have unique properties, and are located far away from the main bulk of the data. These are the extracts of *S. glutinosa* (sample 13, with the large score value on PC1) and *S. officinalis* (sample 20, with a large score value on PC2). The uniqueness of *S. glutinosa* can mostly be explained by the presence of a relatively high peak at  $t_R$  18.75 min whereas for *S. officinalis* a relatively large peak elutes at  $t_R$  11.92 min (Fig. 5e). Selected regions of these two chromatograms are presented in Fig. 5f; the differences between them are very distinctly evident.

## Conclusions

Preprocessing of chromatographic fingerprints is a crucial step which can be regarded as compulsory before commencing comparative analysis by use of chemometric techniques. Depending on the type of chromatographic signal and the problem scrutinized, different preprocessing of the chromatograms can prove necessary. When more than one type of preprocessing is required, however, it is necessary to choose the sequence of different preprocessing methods carefully. In this paper, we used a four-step preprocess-

ing strategy that can be followed when dealing with chromatographic fingerprints of plant extracts.

Many different chemometric techniques are suitable for exploratory analysis of chromatographic data. Among these, principal component analysis (PCA) has attracted most attention, because it enables study of differences among samples and acquisition of information on contributions of the original variables. For chromatographic signals, one can pinpoint relevant fingerprint regions that contain information valid for explanation of data structure observed on the score plot. Thus, it is potentially possible to collect a specific sample fraction and perform additional analyses that can support identification of the compounds of interest present in that fraction.

By applying PCA to fingerprints of the volatile fraction of different *Salvia* L. species it was possible to discover important regions explaining the differences among the samples scrutinized. The differences among the samples are mostly because of the presence of camphene, limonene, and eucalyptol.

## References

- [1] S.J. Wagstaff, A Phylogenetic Interpretation of Pollen Morphology in Tribe MerAheae (Labiatae). In: R.M. Hariey and T. Reynolds (Eds) *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanical Gardens, Kew, UK, 1992, pp 113–124
- [2] M. Ahmed, I.P. Ting, and R.W. Scora, *J. Essent. Oil Res.*, **6**, 223–228 (1994)
- [3] L.E.W. Codd, *Lamiaceae*. In: *Flora of Southern Africa* 28, 4. Botanical Research Institute, Pretoria, 1985
- [4] Z. Mirek, H. Piękoś-Mirkowa, A. Zając, and M. Zając, *Vascular Plants of Poland – A Checklist*. Władysław Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Science, Kraków, 1995
- [5] Y. Okuno and M. Miyazawa, *Lett. Drug Des. Discov.*, **1**, 66–68 (2004)
- [6] Y.-Z. Liang, P. Xie, and K. Chan, *J. Chromatogr. B*, **812**, 53–70 (2004)
- [7] J.H. Christensen, G. Tomasi, and A.B. Hansen, *Environ. Sci. Technol.*, **39**, 255–260 (2005)
- [8] K.M. Aberg, R.J.O. Torgrip, and S.P. Jacobsson, *J. Chemometrics*, **18**, 456–473 (2004)
- [9] G. Malmquist, *J. Chromatogr. A*, **687**, 89–100 (1994)
- [10] A.M. van Nederkassel, C.J. Xu, P. Lancelin, M. Sarraf, D.A. MacKenzie, N.J. Walton, F. Bensaid, M. Lees, G.J. Martin, J.R. Desmurs, D.L. Massart, J. Smeyers-Verbeke, and Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1120**, 291–298 (2006)
- [11] M. Daszykowski and B. Walczak, *Trends Anal. Chem.*, **25**, 1081–1096 (2006)
- [12] D.L. Massart and L. Kaufman, *The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis*, R.E. Krieger, Florida, 1989
- [13] F.C. Sánchez, B. van den Bogaert, S.C. Rutan, and D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **34**, 139–171 (1996)
- [14] A. de Juan and R. Tauler, *Anal. Chim. Acta*, **500**, 195–210 (2003)
- [15] M. Daszykowski, B. Walczak, and D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **65**, 97–112 (2003)

- [16] P.H.C. Eilers, *Anal. Chem.*, **76**, 404–411 (2004)
- [17] D.F. Thekkudan and S.C. Rutan, Denoising and Signal-to-Noise Ratio Enhancement: Classical Filtering. In: S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak (Eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, pp. 9–24
- [18] J. Trygg, J. Gabrielsson, and T. Lundstedt, Background Estimation, Denoising, and Preprocessing. In: S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak (Eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, pp. 1–8
- [19] B. Walczak and D.L. Massart, *Trends Anal. Chem.*, **16**, 451–463 (1997)
- [20] B. Walczak and D.L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **36**, 81–94 (1997)
- [21] B. Walczak, *Wavelets in Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2000
- [22] S. Mallat, *IEEE T. Pattern Anal.*, **11**, 674–693 (1989)
- [23] F.-T. Chau, Y.-Z. Liang, J. Gao, X.-G. Shao, *Chemometrics from basics to wavelets*, Wiley, Hoboken, 2004
- [24] G. Malmquist and R. Danielsson, *J. Chromatogr. A*, **687**, 71–88 (1994)
- [25] N.-P.V. Nielsen, J.M. Carstensen, and J. Smedsgaard, *J. Chromatogr. A*, **805**, 17–35 (1998)
- [26] B. Walczak and W. Wu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **77**, 173–180 (2005)
- [27] A.M. van Nederkassel, M. Daszykowski, P.H.C. Eilers, and Y. Vander Heyden, *J. Chromatogr. A*, **1118**, 199–210 (2006)
- [28] J. Forshed, I. Schuppe-Koistinen, and S.P. Jacobsson, *Anal. Chim. Acta*, **487**, 189–199 (2003)
- [29] J.H. Jellema, Variable Shift and Alignment. In S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak (Eds) *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, pp. 86–108
- [30] V. Pravdova, B. Walczak, and D.L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, **456**, 77–92 (2002)
- [31] S. Wold, K. Esbensen, and P. Geladi, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **2**, 37–52 (1987)
- [32] G. Grygierczyk, M. Sajewicz, D. Staszek, Ł. Wojtal, M. Waksmundzka-Hajnos, and T. Kowalska, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, **32**, 1223–1240 (2009)
- [33] J. Rzepa, Ł. Wojtal, D. Staszek, G. Grygierczyk, K. Labe, M. Hajnos, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 575–580 (2009)
- [34] <http://www-stat.stanford.edu/software/wavelab/index.html>
- [35] [http://www.models.kvl.dk/source/DTW\\_COW/index.asp](http://www.models.kvl.dk/source/DTW_COW/index.asp)
- [36] M. Daszykowski and B. Walczak, *J. Chromatogr. A*, **1176**, 1–11 (2007)
- [37] R.A. van den Berg, H.C.J. Hoefsloot, J.A. Westerhuis, A.K. Smilde, and M.J. vander Werf, *BCM Genomics*, **7**, 142 (2006)
- [38] M.M.W.B. Hendriks, L. Cruz-Juarez, D. De Bont, and R.D. Hall, *Anal. Chim. Acta*, **545**, 53–64 (2005)
- [39] S.D. Brown, R. Tauler, and B. Walczak, *Comprehensive Chemometrics*, Elsevier, Amsterdam, 2009, vol. 2, Data Preprocessing

Accepted by TK

## LOW TEMPERATURE PLANAR CHROMATOGRAPHY– DENSITOMETRY AND GAS CHROMATOGRAPHY OF ESSENTIAL OILS FROM DIFFERENT SAGE (*SALVIA*) SPECIES

Mieczysław Sajewicz,<sup>1</sup> Łukasz Wojtal,<sup>1</sup> Dorota Staszek,<sup>1</sup> Michał Hajnos,<sup>2</sup>  
Monika Waksmundzka-Hajnos,<sup>3</sup> and Teresa Kowalska<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, Silesian University, Katowice, Poland

<sup>2</sup>Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

<sup>3</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, Lublin, Poland

□ Essential oils of plant origin are the multicomponent mixtures of mono-, di-, tri-, and sesquiterpenes. Due to their recognized curative, cosmetic, and nutritional properties on the one hand and an outstanding modern analytical potential on the other, qualitative and quantitative composition of essential oils currently is in the focus of interest for phytochemistry and pharmacognosy. Due to the recognized volatility of the essential oil components, in their case the analytical method of choice is gas chromatography with mass spectrometric detection (GC-MS). However, great versatility of planar chromatography has resulted in a number of successful applications of this relatively simple and inexpensive separation technique to the investigations on composition of the volatile plant constituents as well. Generally, the low temperature preparative layer chromatography (PLC) is used for preliminary fractionation of the essential oils, and the separated fractions are further analyzed by means of GC-MS. In this study, we scrutinized a possibility of using the low temperature analytical thin-layer chromatography (TLC) to fingerprinting of the essential oils originating from the five different sage (*Salvia*) species, i.e., *S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*. We also used the low temperature PLC for the preliminary fractionation of these essential oils prior to the GC-MS analysis. It was shown that the low temperature TLC can successfully be applied to fingerprinting the different sage (*Salvia*) species. Fractionation of the essential oils from the sage species by means of the low temperature PLC prior to the GC-MS analysis is also possible, although individual stages of the approach still need an additional optimization.

**Keywords** essential oils, GC-MS, low temperature planar chromatography, PLC-densitometry, *Salvia* espe., terpenes, TLC-densitometry

Address correspondence to Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland. E-mail: [teresa.kowalska@us.edu.pl](mailto:teresa.kowalska@us.edu.pl); Monika Waksmundzka-Hajnos, Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland. E-mail: [Monika.Hajnos@am.lublin.pl](mailto:Monika.Hajnos@am.lublin.pl)

## INTRODUCTION

Essential oils have been recognized for ages now as substances of plant origin that possess highly appreciated curative, cosmetic, and nutritional properties. In purely chemical terms, essential oils are the multicomponent mixtures of mono-, di-, tri-, and sesquiterpenes. Structurally, these compounds can belong to the groups of hydrocarbons, alcohols, aldehydes, ketones, esters, and ethers. At ambient temperature, many of them appear as liquids and display an oily consistency. Their positive impact on somatic and mental health has been recognized in a remote antiquity. Ancient Egyptians highly valued the olfactory properties of the sage species. Rich men and women have used aromatic essential oils to moisturize their bodies and protect their skin against the influence of an arid climate. Ancient Greeks adapted the Egyptian medical knowledge and utilized aromatic essential oils for curative massages.

In present time, essential oils are widely used in aromatherapy (for different inhalations, aromatic baths, and massages). However, essential oils usually are complicated mixtures and their composition is, in most cases, not fully established. Due to that, they cannot be prepared in laboratories, neither can they be considered as strictly curative formulations by doctors and pharmacists, which is a good reason to intensify studies on essential oils. Their pharmacological action is diverse. Owing to disinfection properties, essential oils hamper the growth of various different pathogenic microorganisms, e.g., they prove helpful in combating skin parasites and fungi. Individual constituents often appear in high concentrations (e.g., in order to obtain one drop of rose oil, ca. 30 fresh flowers are needed) and for this reason, essential oils cannot be applied to human skin in a pure form.

There are several sage oils used for aromatherapy purposes which are often confused (e.g., Clary Sage, Common Sage, and Spanish Sage).<sup>[1–3]</sup> They have differing aromatic uses. Some of them (e.g., *S. sclarea*) have a high chemical component of esters and are generally considered as non-sensitizing and non-toxic. These essential oils are considered antiseptic, digestive, sedative, deodorant, and aphrodisiac. Apart from being well known for their euphoric and ‘feel good’ actions, they are also used for menopausal symptoms, nervous fatigue, scanty periods, varicose veins, and in the anti-aging and the post-natal depression treatments.

Some of essential oils derived from sage, with a high percentage of ketones in their chemical composition (e.g., *S. officinalis*) are considered as more toxic. These essential oils are analgesic, anti-viral, bactericidal, antiseptic, diuretic, decongestant, and abortive in their actions. They can be used for the treatment of angina, menopausal symptoms, irregular periods, conceptual difficulties, anxiety, rheumatism, thrush, herpes, and nervous debility. They are also a source of natural anti-oxidants.

Certain essential oils derived from sage (e.g., *S. lavandulifolia*) are composed mainly of alcohols, but also contain a certain amount of ketones. Actions of this group of essential oils is recognized as anti-depressant, anti-inflammatory, analgesic, balancing, immune boosting, and hormonally balancing. They can be used to treat skin infections, stress, gum infections, hair loss, fluid retention, amenorrhea, and dysmenorrhoea, headaches, muscular aches and pains, asthma, and arthritis. They also have the properties of being astringent, digestive, nerve tonic, and deodorant. It should be emphasized that the safety of using certain sage derived essential oils is questioned by some therapists because of a high level of thujone, which has been found as a neurotoxic compound.

Appreciating high versatility of planar chromatography, we tested its applicability in the analytical (TLC) and preparative (PLC) mode to fingerprinting and fractionating essential oils obtained from the five different sage (*Salvia*) species, i.e., from *S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*.

## EXPERIMENTAL

### Materials and Reagents

Samples of the five different sage (*Salvia*) species (*S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*) investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of Medical University, Lublin, Poland, on August 20th, 2007. Plant material was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. Finally, 50 g of each plant species was weighed and powdered in a porcelain mortar. Three replicates of each sample were processed in an identical way.

In our investigations, solutions of the pine, mint, eucalyptus, and juniper essential oils with a strictly defined chemical composition were employed (manufactured by Apotheca Pacis, Rybnik, Poland), which helped to attribute the retention times of the volatile sage components to the terpenes contained in these standards.

Thin-layer chromatographic separations were performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25 mm layers of silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. no. 1.05715) and preparative-layer chromatographic separations were performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 2 mm layers of silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, cat. no. 1.05745).

For planar chromatography, methanol, hexane, toluene, and ethyl acetate were used (all solvents were of analytical purity grade and manufactured by POCh, Gliwice, Poland). Planar chromatograms were developed in sandwich DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland).

### Vapor Distillation of Essential Oils from *Salvia* Species

The dried plant material (50 g) was placed in the round bottomed flask and 400 mL water was added. Vapor distillation was carried out for 3 h with use of the Deryng apparatus. The procedure is described in Polish Pharmacopoeia VI<sup>[4]</sup> and earlier it has proved more effective than traditional solvent extraction and instrumental accelerated solvent extraction (ASE) for this particular purpose, as documented in our comparative study.<sup>[5]</sup>

Volumes of the distilled essential oils were the following ones: with *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, 0.5 mL per 50 g of the dried plant material (ca. 1%, *v/w*); and with *S. hians*, *S. staminea*, and *S. nemorosa*, 0.05 mL per 50 g of the dried plant material (ca. 0.1% *v/w*). Thus, the first two sage species (*S. lavandulifolia* and *S. triloba*) can be regarded as rich in essential oils, while the remaining three species (*S. hians*, *S. staminea*, and *S. nemorosa*) yielded roughly ten times less essential oils and consequently, they cannot be regarded as particularly oily species.

For the purpose of the TLC analysis, the aliquots of 0.05 mL essential oil samples with all five sage species were diluted with *n*-hexane to obtain the volume of 1 mL. For the purpose of the PLC analysis, essential oils originating from the two oily species, i.e., from *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, were used undiluted.

### Thin Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatographic analysis is the pilot procedure, necessary to establish the separation conditions needed at the next step, i.e., for the preparative separation of essential oils. Each essential oil originating from vapor distillation was spotted onto the thin layer in the aliquot of 15  $\mu$ L *n*-hexane solution using an AS 30 model autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). Development of the chromatograms was carried out at two different temperatures, i.e., at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  (at the laboratory bench top) and  $-10 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (inside the refrigerator), for a distance of 15 cm in the one dimensional development mode, using the binary mobile phase toluene–ethyl acetate (95:5; *v/v*).<sup>[6]</sup>

The chromatograms were developed in the sandwich chromatographic chambers saturated with mobile phase for 15 min. Then the developed chromatograms were dried for 3 h at ambient air and eventually evaluated by means of densitometry. Acquisition of the densitograms was carried out with a Desaga CD 60 model densitometer equipped with Windows compatible ProQuant software (Desaga). Concentration profiles of the development lanes for the sage samples were recorded in reflected ultraviolet (UV) light from a deuterium lamp at 340 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm  $\times$  0.1 mm. The obtained densitograms were primarily assessed for providing the fingerprint response.

### Preparative Layer Chromatography (PLC)

A 40  $\mu\text{L}$  aliquot of an undiluted essential oil extract from both oily sage species, i.e., from *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, was applied to a preparative layer by means of the AS 30 model Desaga autosampler. Application was band wise with a band width of 16 cm. These separations were carried out using a procedure analogous to that employed in TLC, i.e., using the binary mixture toluene–ethyl acetate (95:5; *v/v*) as the mobile phase. The chromatographic plates were developed inside the refrigerator at  $-10 \pm 2^\circ\text{C}$  in the sandwich chambers saturated with mobile phase for 15 min, for a distance of 15 cm. Based on the densitometrically established fingerprints, the preparative chromatograms were divided into two sections. Each section of the silica gel layer was carefully scraped from the plate, mixed with 10 mL methanol, and placed in an ultrasonic bath for 30 min. The ultrasonicated solution was passed through an Anotop syringe filter with aluminium oxide adsorbent in order to separate silica gel particles from the liquid, and the 1  $\mu\text{L}$  aliquots were analyzed by means of GC-MS.

### Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection (GC-MS)

The GC-MS analyses were carried out with use of a TRACE 2000 model capillary gas chromatograph with an MS TRACE model mass detector (ThermoQuest, Waltham, MA, USA), equipped with a CTC Analytics model autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland), working in the head space and non-head space mode. The analyses were run with use of the DB-5 capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., film thickness 0.25 mm; manufactured by Agilent Technologies, Palo Alto, CA/formerly J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Helium ( $p = 100 \text{ kPa}$ ) was used as carrier gas. Gradient analysis was run, using the following temperature program:  $40^\circ\text{C}$  (3 min); 40 to  $150^\circ\text{C}$  ( $8^\circ/\text{min}$ ); isothermal conditions,  $150^\circ\text{C}$  (15 min). The temperature of the injector was kept constant at  $150^\circ\text{C}$ . Mass spectrometer was fitted with an EI source operated at 70 eV.

Identification of the compounds originating from the respective essential oils vapor distilled from sage and preliminarily fractionated by means of the low temperature PLC was based on an agreement between retention times of the known components of the ether oil standards (i.e., of the pine, mint, eucalyptus, and juniper essential oil) with those obtained from the sage species, and on a comparison of the mass spectra of the sage components with those from the NIST Mass Spectral Library with the Search Program in the GC/MS system software.



## RESULTS AND DISCUSSION

### Thin Layer Chromatography (TLC)

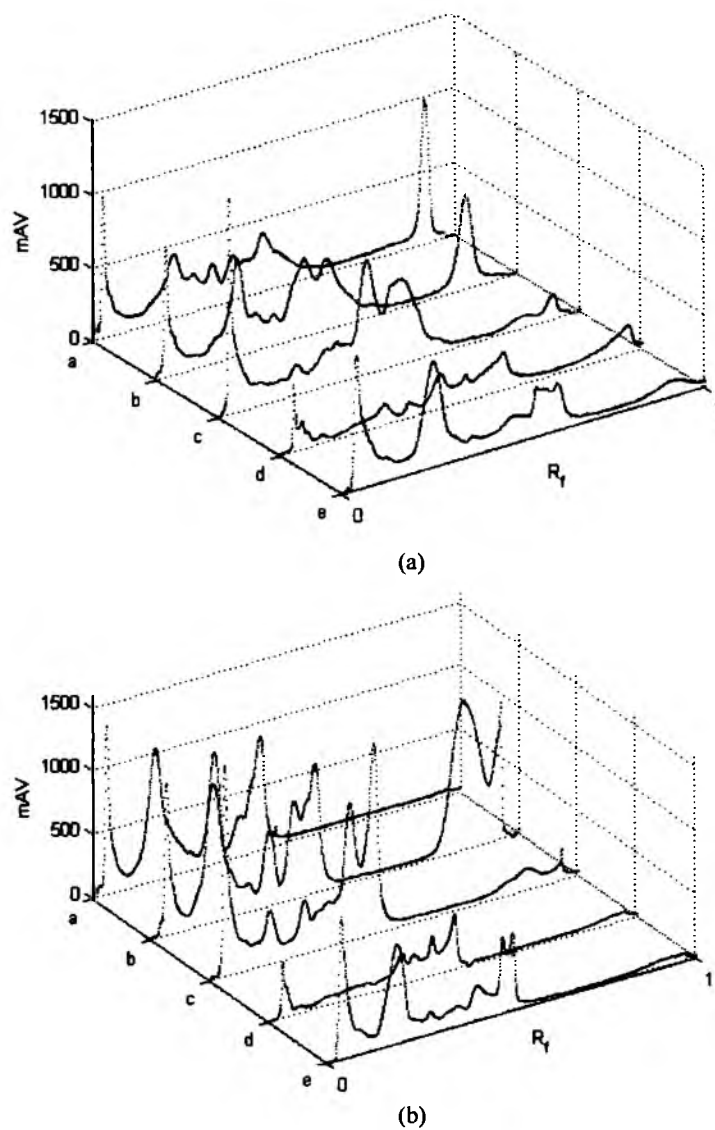
In the pilot TLC study, we elaborated the temperature conditions for further fractionation of the essential oils by means of PLC. Within the framework of this study, we compared two different temperatures of running the chromatographic development (i.e., ambient temperature of 22°C and the temperature of –10°C obtained inside the refrigerator). The development carried out at –10°C provided considerably better results both in qualitative and quantitative terms than that carried out at 22°C (which can easily be deduced from a comparison of the respective densitograms shown in Figs. 1a,b). These densitograms (i) witness to a possibility of separating essential oils by means of planar chromatography, and at the same time (ii) they clearly demonstrate superiority of developing the chromatograms at –10°C than at an ambient temperature, which is rather understandable with volatile compounds.

For our purpose, we tested the mixed mobile phase earlier reported in publication<sup>[6]</sup> as an eluent suitable for the low temperature preparative layer separation of the essential oils contained in *Carum carvi* L., *Mentha piperita* L., *Juniperus communis* L., and *Chamomilla recutita* L.). This suitability was considered in terms of a sufficient elution power in combination with reasonable viscosity, and we managed to show that the same eluent is well suited for the low temperature separation of essential oils originating from the sage species also.

Finally, it can be stated that the low temperature TLC densitometry has proved very useful in fingerprinting essential oils contained in the different sage species as a well performing analytical technique in its own right. This conclusion can be drawn from the distinct and differentiated densitogram patterns presented in Fig. 1b.

### Preparative Layer Chromatography

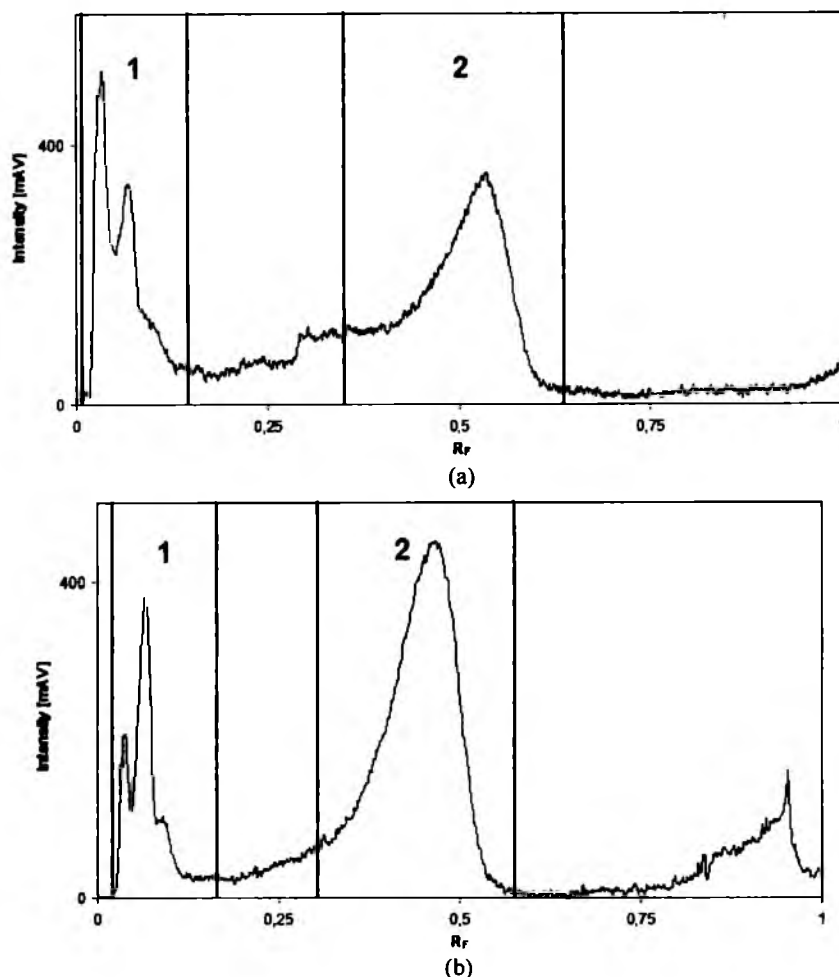
In Figs. 2a,b, we showed the densitograms derived from the preparative layer chromatograms valid for *S. lavandulifolia* and *S. triloba*. Due to greater thickness of preparative layers compared with analytical ones, and also to incomparably higher sample aliquots spotted onto the preparative layers (because of an acceptable layer overload in the PLC mode), the separation performance of PLC was worse than that of TLC, and the concentration profiles derived from PLC were less diversified than those derived from TLC. Consequently, the preparative layer chromatograms obtained for *S. lavandulifolia* and *S. triloba* could only be divided into the two fractions (as marked in Figs. 2a,b).



**FIGURE 1** A comparison of the densitograms obtained from the analytical thin layer chromatograms developed for essential oils of the five different sage species: a, *S. hians*, b, *S. staminea*, c, *S. nemorosa*, d, *S. triloba*., and e, *S. lavandulifolia*, depending on the developing temperature; (a)  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and (b)  $-10 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

### Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection (GC-MS)

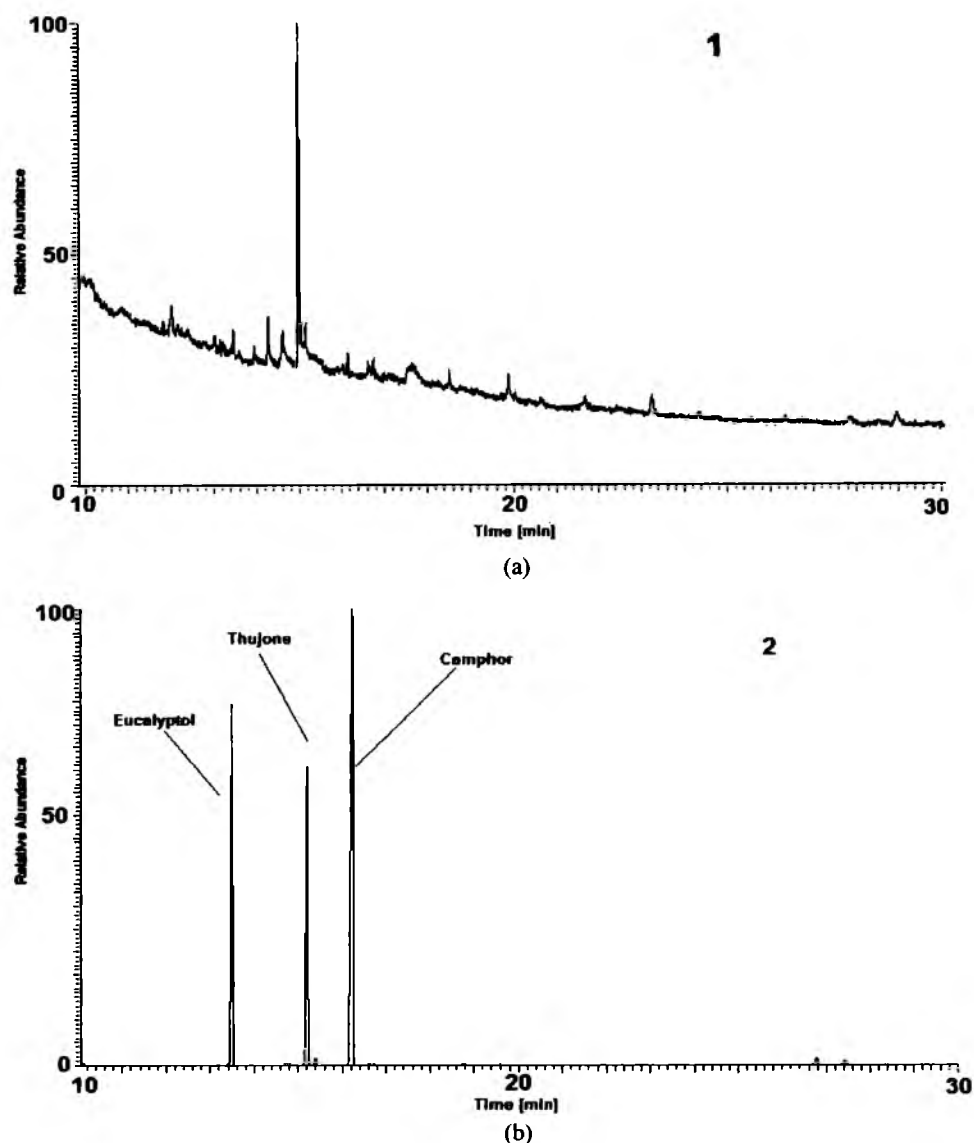
In Figs. 3a,b, we presented gas chromatograms valid for fraction 1 and 2, respectively, of the essential oil originating from *S. lavandulifolia* and



**FIGURE 2** Densitograms of the preparative layer chromatograms for the undiluted essential oils derived from (a) *S. lavandulifolia* and (b) *S. triloba* with use of the Deryng apparatus and spotted on to the plate in the 40  $\mu$ L aliquot. Development temperature:  $-10 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

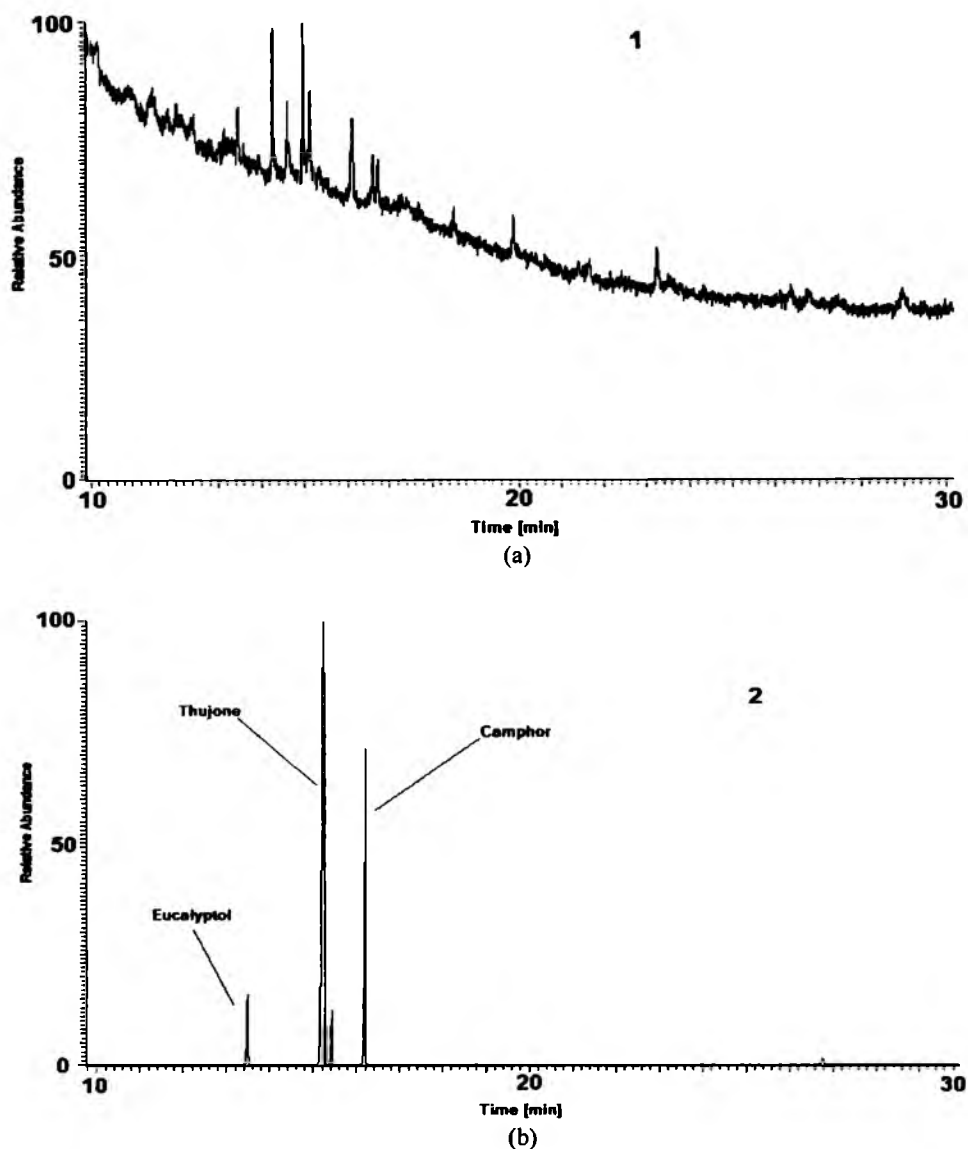
fractionated by means of PLC. In Figs. 4a,b, the analogous gas chromatograms are presented, valid for *S. triloba*. *Salvia lavandulifolia* and *Salvia triloba* were specially selected for the PLC fractionation of the respective essential oils as the two species particularly rich in essential oils.

From the results shown in Figs. 3 and 4, it comes out that in both cases, three different terpenes were identified in fraction 2 (namely, eucalyptol, thujone, and camphor). In fraction 1, several distinct peaks were observed both for *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, yet none of these peaks was identified in this study.



**FIGURE 3** Gas chromatograms obtained from (a) fraction 1 and (b) fraction 2, respectively, of the essential oil derived from *S. lavandulifolia* by means of PLC (see Fig. 2a). In fraction 2, eucalyptol, thujone, and camphor were identified (based on the NIST library of the spectra and on the pine, mint, eucalyptus, and juniper essential oil standards).

The identification results by means of GC-MS can be regarded as satisfactory, especially when compared with those from our earlier study presented in publication.<sup>[7]</sup> From the results given in Table 1 of this previous study,<sup>[7]</sup> it comes out that eucalyptol, thujone, and camphor appear among several most abundant terpenes present in *S. lavandulifolia*. From



**FIGURE 4** Gas chromatograms obtained from (a) fraction 1 and (b) fraction 2, respectively, of the essential oil derived from *S. triloba* by means of PLC (see Fig. 2b). In fraction 2, eucalyptol, thujone, and camphor were identified (based on the NIST library of the spectra and on the pine, mint, eucalyptus, and juniper essential oil standards).

the same source (Table 1<sup>[7]</sup>) it also comes out that eucalyptol, thujone, and camphor are three out of four terpenes identified in *S. triloba*, and these three terpenes are the most abundant ones. However, inability to identify several other terpenes present in *S. lavandulifolia* and one terpene ( $\alpha$ -pinene) present in *S. triloba* points out to the fact that the aliquots of

essential oils applied to the preparative layer were too low. Thus, a conclusion can be drawn that the essential oil aliquots employed for the preparative layer fractionation have to be carefully optimized (and apparently, in an individual manner, depending on the considered sage species).

The main bottleneck of the PLC fractionation of terpenes is the necessity to use considerable volumes of solvents for washing out fraction components from the scraped silica gel layer and a problem with further removal of these solvents and condensation of the compounds of interest, due to an obvious volatility thereof. Current research carried out in our laboratory is focused on elaborating the possibly most efficient coupling of the low temperature preparative layer fractionation of essential oils with the final step of the GC-MS identification of the constituents of individual fractions.

## CONCLUSIONS

Generally, planar chromatography is not dedicated to the analysis of any volatile organic compounds (in this case, the analytical method of choice usually is GC-MS). Hence, planar chromatographic analysis of essential oils is a relatively difficult analytical task.

In certain cases, though, the low temperature planar chromatography can be used for preliminary fractionation of essential oils, in order to facilitate further analysis of the respective fractions by means of GC-MS.

Temperature considerably influences planar chromatographic analysis of essential oils. Lowering of the temperature improves both, separation performance and the yields of the separated fractions.

Silica gel – the most active adsorbent in the planar chromatographic arsenal – is the stationary phase of choice for the low temperature analytical and preparative fractionation of essential oils derived from plant material, as it effectively “fixes” volatile compounds on solid surface through the adsorptive forces.

It was demonstrated that the low temperature TLC densitometry can successfully be used for fingerprinting of essential oils contained in the different sage species as an analytical technique in its own right.

The results presented in this study demonstrate usefulness of PLC for preliminary fractionation of the essential oils derived from the sage species for the purpose of the GC-MS analysis. However, the quantities of essential oils contained in the different sage species can largely differ and hence, separate optimization of the essential oil aliquots applied to the preparative layers is needed for each individual sage species.

This paper is a preliminary report, which confirms usefulness of the low temperature TLC and the low temperature PLC for the analysis of essential oils contained in the sage species.

## ACKNOWLEDGMENT

The work of two authors (Ł.W. and D.S.) was partially supported by the PhD scholarship granted to them in 2009 within the framework of the ‘University as a Partner of the Economy Based on Science’ (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

## REFERENCES

1. Caddy, R. *Essential Oils in Color*, Amberwood Publishing: Kent, UK, 1997.
2. Lawless, J. *The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils*, Element: London, UK, 1995.
3. Price, S. *Aromatherapy Workbook*, Thorsons: London, UK, 2000.
4. *Polish Pharmacopoeia VI*, Polish Pharmaceutical Society: Warsaw, 2002.
5. Sajewicz, M.; Rzepa, J.; Hajnos, M.; Wojtal, Ł.; Staszek, D.; Kowalska, T.; Waksmundzka-Hajnos, M. GC–MS study of the performance of different techniques for isolating the volatile fraction from sage (*Salvia L.*) species, and comparison of seasonal differences in the composition of this fraction. *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 453–471.
6. Koch, A.; Basar, S.; Richter, R. TLC of Mono- and Sesquiterpenes, in *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., Eds.; CRC Press/Taylor and Francis Group: Boca Raton, FL, 2008; 451–480.
7. Rzepa, J.; Wojtal, Ł.; Staszek, D.; Grygierczyk, G.; Labe, K.; Hajnos, M.; Waksmundzka-Hajnos, M. Fingerprint of selected *salvia* species by HS–GC–MS analysis of their volatile fraction. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 575–580.

# Low-Temperature TLC–MS of Essential Oils from Five Different Sage (*Salvia*) Species

Mieczysław Sajewicz, Łukasz Wojtal, Michał Hajnos, Monika Waksmundzka-Hajnos, and Teresa Kowalska\*

## Key Words

Low-temperature TLC–MS  
Essential oils  
Terpenes and terpenoids  
*Salvia* sp.

## Summary

In a previous paper we discussed the possibility of fractionating the essential oils of different sage species by low-temperature preparative layer chromatography (PLC), followed by preparative isolation of the contents of each fraction and further analysis by GC–MS. In that way we attempted to emphasize the practical usefulness of low-temperature planar chromatography for investigation of volatile compounds. In this study, we explore a possibility of fractionating essential oils contained in the different sage species by low-temperature analytical TLC followed by direct mass spectrometric analysis of the separated fractions. This objective can be achieved by TLC–MS with on-line transfer of the eluted fractions. The densitograms obtained from five different sage species (i.e., *S. lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*) are compared. Each densitogram is accompanied by mass spectra recorded for each peak. Videoscans of the chromatograms are also presented. In this way multiple fingerprints of the analyzed plant material, each comprising a densitogram and a selection of mass spectra, were obtained. Advanced chemometric treatment of these multiple fingerprints can be used to reveal statistically significant differences between the plant species. Analytical and chemotaxonomic advantages and further aspects for this kind of approach are discussed.

## 1 Introduction

The great versatility of analytical and preparative planar chromatography is an indisputable advantage of this long-established and mature separation technique. In some circumstances, planar chromatography can outperform other chromatographic techniques, e.g., when used to solve physicochemical tasks. Its flexibility and robustness are basically because of its relatively simple and inexpensive equipment, the possibility of performing several analyses in parallel on the same chromatographic plate,

and the two-dimensional effective diffusion, particularly helpful in enantiomer separations, as discussed elsewhere [1].

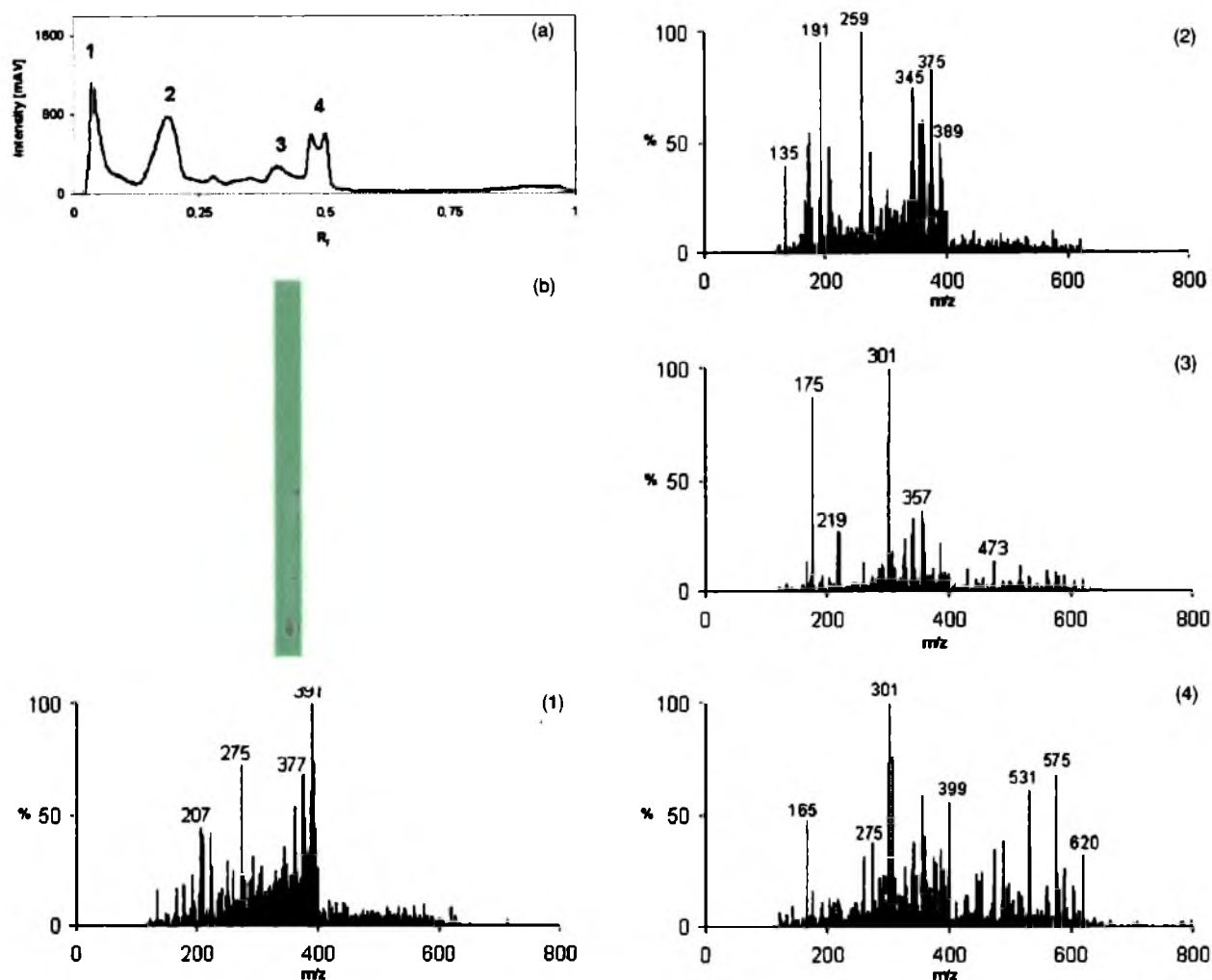
In a series of publications [2–4], very interesting results were presented dealing with separation of volatile compounds of botanical origin (basically essential oils) by low-temperature TLC. Although gas chromatography is the separation technique of choice for volatile compounds, good performance of low-temperature TLC has been convincingly demonstrated. It was shown that silica gel with its strong adsorptive power effectively immobilizes essential oil constituents on the stationary phase surface; these can then be further scrutinized off-line at room temperature by use of a variety of instrumental techniques.

In a previous publication [5], we introduced the low-temperature variant of preparative layer chromatography (PLC) for separation of fractions of the essential oils of five sage (*Salvia*) species, followed by extraction of these fractions from the silica gel layer and ultimate analysis of each fraction by tandem GC–MS. To this effect, we first established separation conditions for analytical low-temperature planar chromatography; we then tested the same conditions for PLC. Understandably, transfer of working conditions from TLC to PLC resulted in deterioration of the separation. Our approach also involved two separation techniques, PLC and GC–MS [5].

An attractive possibility of using mass spectrometric detection in TLC has recently been described [6–8]. The separated chromatographic bands can be eluted from the chromatographic plate (by use of a TLC–MS interface) directly into the mass spectrometer. For samples with few components, full separation of single compounds and, hence, recording of single mass spectra is possible. With complex mixtures, thin-layer fractionation into less complex mixtures is possible, and the mass spectrometric outcome is in the form of the fingerprints characteristic of a given fraction. These fingerprints can, in the next step of the multi-stage study, undergo advanced chemometric treatment with the objective of revealing statistically significant differences between the individual plant species. We therefore decided to replace low-temperature PLC fractionation of the essential oils of the sage species then GC–MS fingerprinting of the isolated fraction by the tandem TLC–MS approach.

M. Sajewicz, Ł. Wojtal, and T. Kowalska, Institute of Chemistry, Silesian University, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland; M. Hajnos, Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin, 1 Chodźki Str., 20-093 Lublin, Poland; and M. Waksmundzka-Hajnos, Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland.  
E-mail: teresa.kowalska@us.edu.pl





**Figure 1**  
Densitogram (a), videoscan (b) obtained from the essential oil of *S. lavandulifolia*, and mass spectra of separated chromatographic bands (1)–(4).

In the work discussed in this paper we used this approach to characterize the essential oils of the same five sage species [5]. In that way we benefited from good low-temperature TLC resolution of chromatographic bands, avoided the tedious task of scraping the adsorbent from the TLC plates, and eliminated the time-consuming GC–MS analysis. Ultimately, we obtained multiple fingerprints for each essential oil that consist of one densitogram and several mass spectra, one for each separated chromatographic band. Videoscans of the chromatograms were also obtained. The analytical and chemotaxonomic importance of this approach to investigation of botanical material is also discussed.

## 2 Experimental

### 2.1 Materials and Reagents

Samples of the five different sage species (*Salvia lavandulifolia*, *S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*) investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of

Medical University, Lublin, Poland, in June, 2008. Plant material was dried for 40 h at 35 to 40°C in an oven with a forced air flow. Finally, 50 g of each plant species was weighed and powdered in a porcelain mortar. Three replicates of each sample were processed in an identical way.

Methanol, *n*-hexane, toluene, and ethyl acetate used for TLC were of analytical purity grade and manufactured by POCh (Gliwice, Poland).

### 2.2 Vapor Distillation of Essential Oils from *Salvia* species

Dried plant material (50 g) was placed in a round-bottomed flask and 400 mL water was added. Vapor distillation was conducted for 3 h with use of a Deryng apparatus. The procedure is described in Polish Pharmacopoeia VI [9] and has proved more effective than traditional solvent extraction and accelerated solvent extraction (ASE) for this particular purpose, as documented in our comparative study [10].

Yields of the distilled essential oils were: *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, 0.5 mL per 50 g dried plant material (ca. 1%, v/w); *S. hians*, *S. staminea*, and *S. nemorosa*, 0.05 mL per 50 g dried

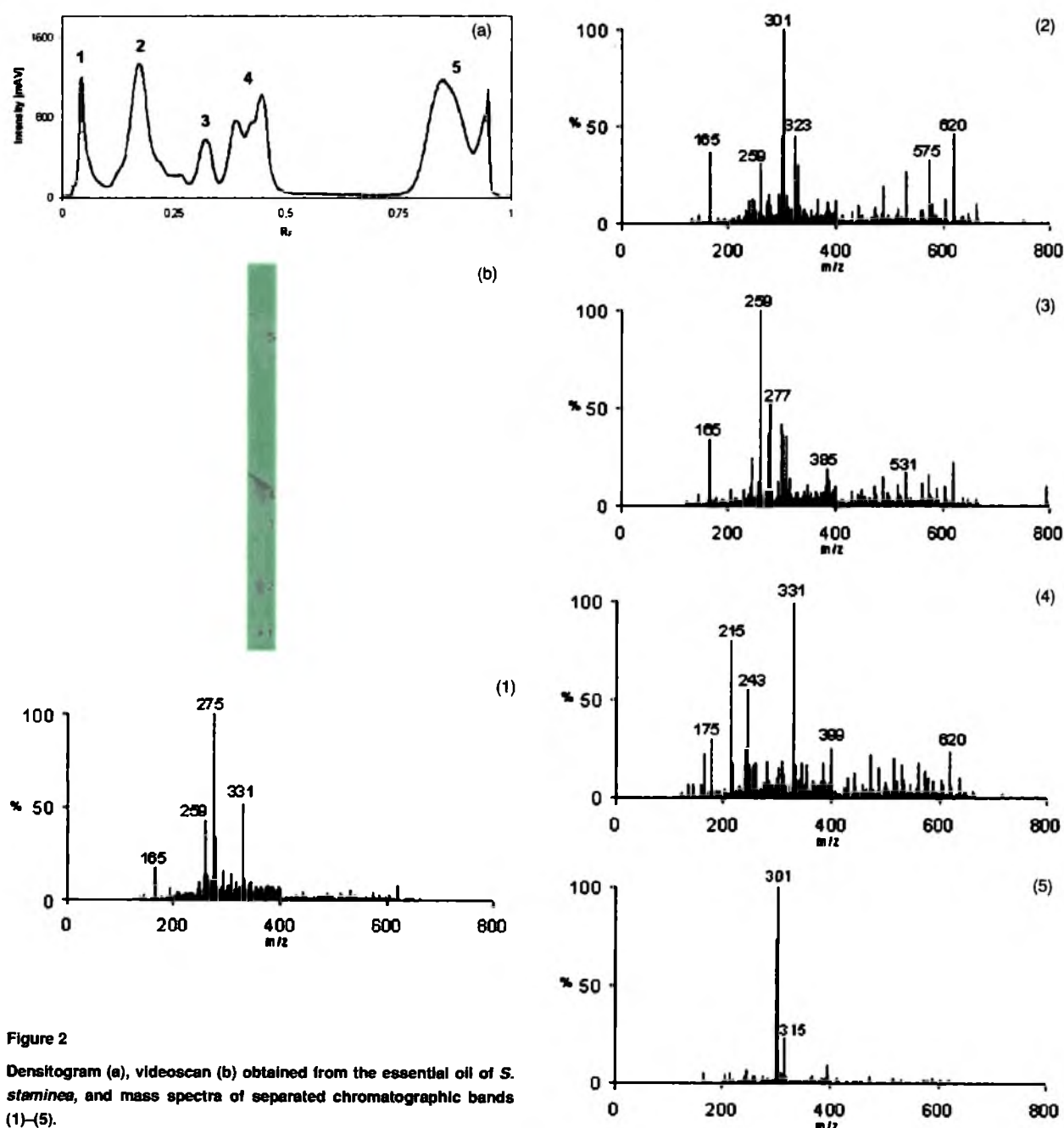


Figure 2

Densitogram (a), videoscan (b) obtained from the essential oil of *S. staminea*, and mass spectra of separated chromatographic bands (1)–(5).

plant material (ca. 0.1% v/w). Thus the first two sage species (*S. lavandulifolia* and *S. triloba*) can be regarded as rich in essential oils whereas the other three species (*S. hians*, *S. staminea*, and *S. nemorosa*) yielded ca a factor of ten less essential oil and, consequently, cannot be regarded as particularly oily species.

For TLC analysis 0.05 mL essential oils from *S. hians*, *S. staminea*, and *S. nemorosa* were diluted to 1 mL with *n*-hexane (volumes of undiluted samples did not allow a sufficient number of analytical replicates). Essential oils from *S. lavandulifolia* and *S. triloba* were used undiluted.

### 2.3 Thin-Layer Chromatography (TLC)

Thin-layer chromatography was performed on 10 cm × 20 cm glass plates precoated with 0.25-mm layers of silica gel 60 F<sub>254</sub>

(Merck, Darmstadt, Germany; #1.05715). Essential oil samples were applied to the layers, either as 15-μL volumes of *n*-hexane solutions of *S. hians*, *S. staminea*, and *S. nemorosa* essential oils or as 5-μL volumes of undiluted *S. lavandulifolia* and *S. triloba* essential oils, by means of an AS 30 sample applicator (Desaga, Heidelberg, Germany). One-dimensional development of the chromatograms, to a distance of 15 cm, at  $-10 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (inside a refrigerator), with toluene–ethyl acetate 95:5 (v/v) as binary mobile phase [4], was performed in DS sandwich chambers (Chromdes, Lublin, Poland) previously saturated with mobile phase vapor for 15 min. The chromatograms were dried for 3 h in ambient air then scanned with a Desaga CD 60 densitometer equipped with Windows-compatible ProQuant software (Desaga). Concentration profiles of the development lanes for the sage samples were recorded in reflected ultraviolet (UV)

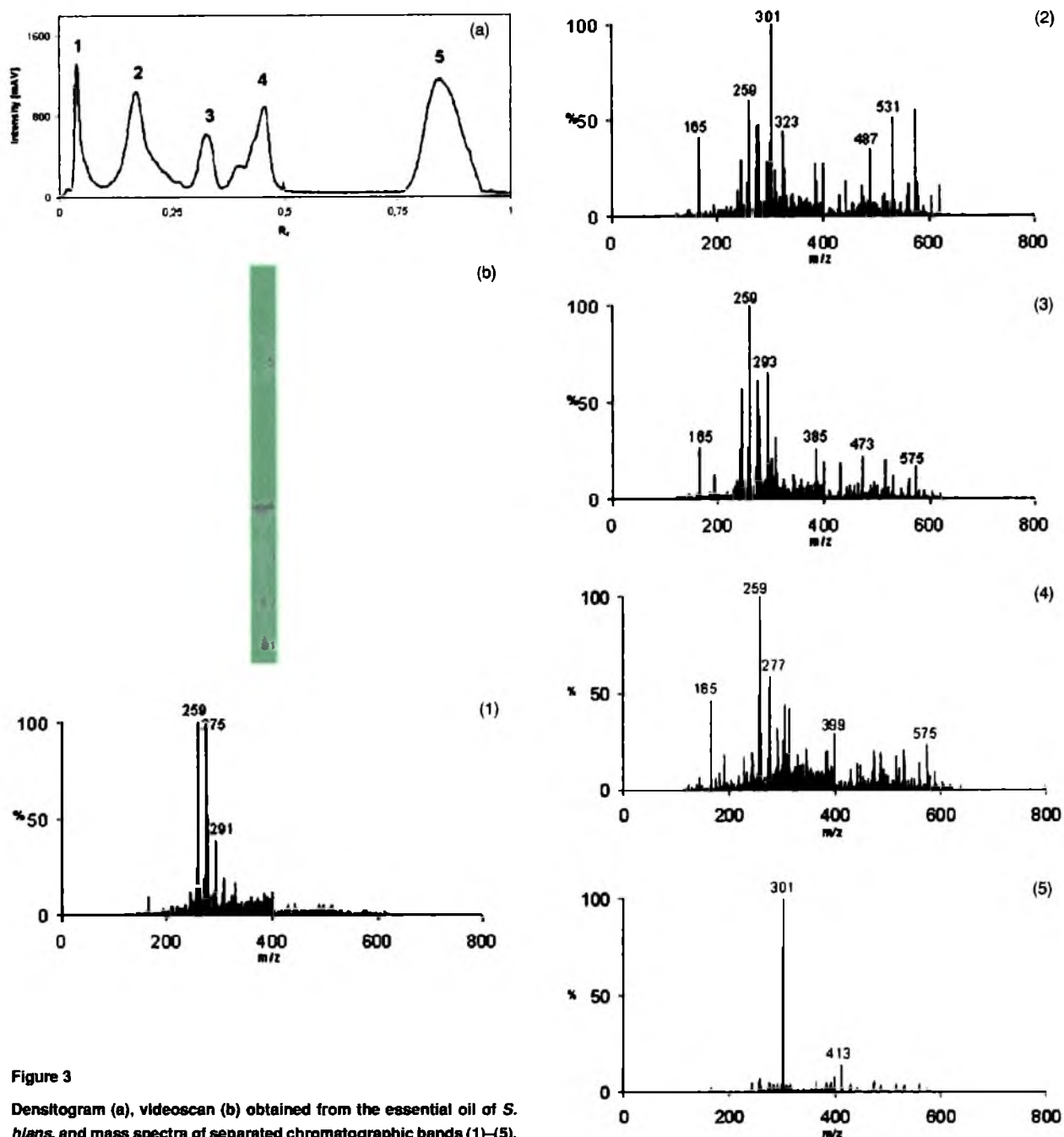


Figure 3

Densitogram (a), videoscans (b) obtained from the essential oil of *S. hlans*, and mass spectra of separated chromatographic bands (1)–(5).

light from a deuterium lamp at 340 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm  $\times$  0.1 mm. The densitograms obtained were primarily assessed for providing a fingerprint response. Chromatograms were also scanned at 254 nm by use of a Chromimage flatbed scanner (AR2i, Le Plessis Robinson, France), and the images of the chromatograms were saved. Each TLC analysis was performed in triplicate.

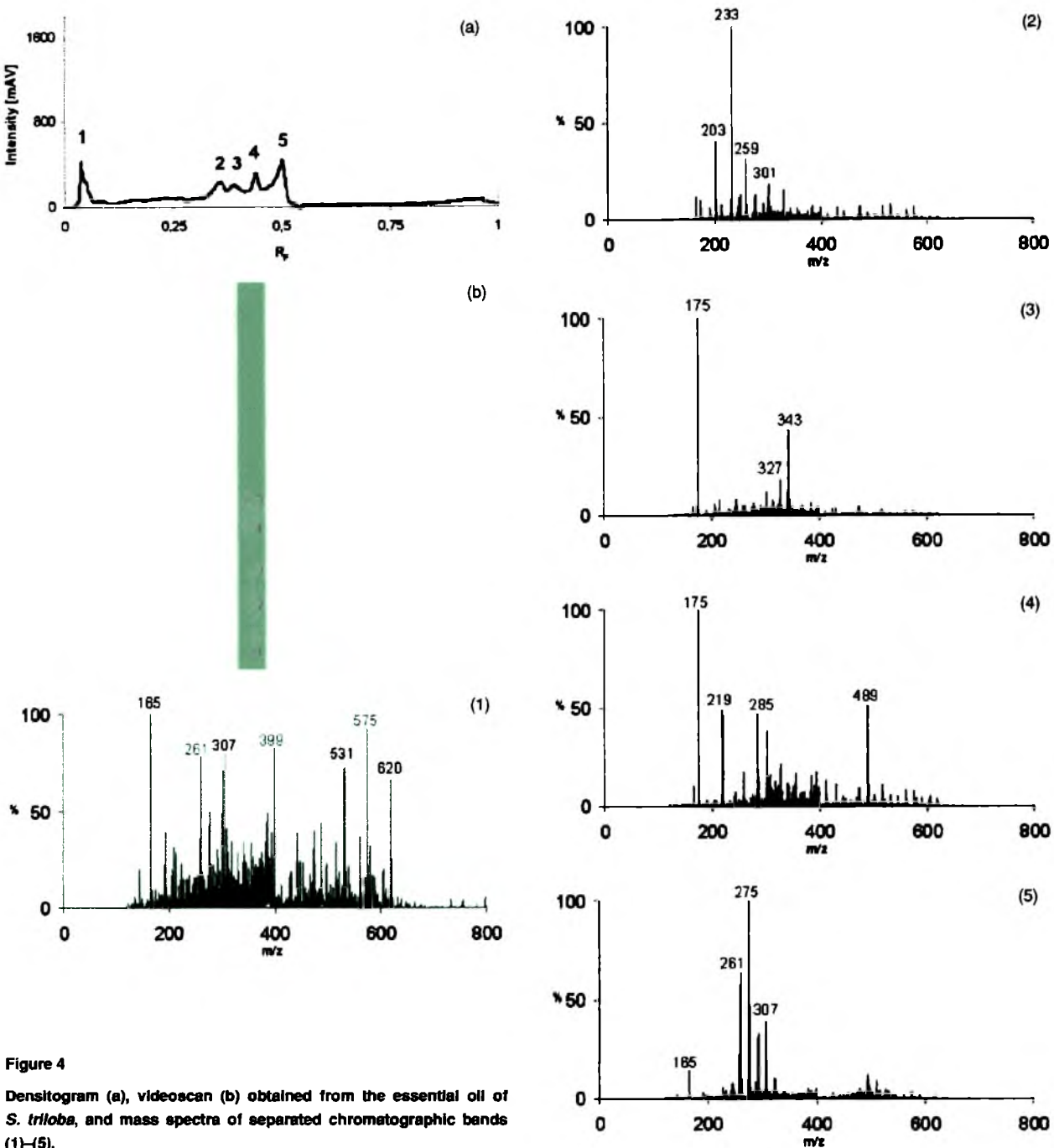
#### 2.4 Mass Spectrometric Analysis of Chromatographic Bands

After densitometry to locate the separated chromatographic bands, bands were selected for mass spectrometric analysis. A CAMAG (Muttens, Switzerland) TLC-MS Interface was used for direct elution of a given band from the plate and its on-

line introduction into a Varian (Harbor City, CA, USA) 500-MS mass spectrometer. In our study, elution was performed at ambient temperature by use of methanol (flow rate 0.2 mL min<sup>-1</sup>). Samples were analyzed in ESI mode (full ESI-MS scan, positive ionization, spray chamber temperature 45°C, drying gas temperature 150°C, drying gas pressure 25 psi, capillary potential 70 V, needle voltage 5 kV). Varian MS Workstation v. 6.9.1 software was used for data acquisition and processing.

### 3 Results and Discussion

In previous papers [10, 11], we presented results from GC-MS analysis of the essential oils from different sage species. Identi-



**Figure 4**  
Densitogram (a), videoscan (b) obtained from the essential oil of *S. triloba*, and mass spectra of separated chromatographic bands (1)–(5).

fication of individual compounds was possible because of gas chromatographic separation of the samples, use of a digital library of mass spectra, and comparison of the retention times of the separated essential oil components with those of the standards.

With complex mixtures of compounds (for example essential oils), thin-layer chromatography can only provide group separation, i.e. fractionation into the less complex mixtures. This alternative procedure can, however, have very appreciable advantages if coupled with a well performing detection system. A mass spectrometer coupled with thin-layer chromatography

via a TLC-MS interface can provide valuable analytical results, as shown in this study.

After the low-temperature development of the chromatograms, the first step was to obtain the respective densitograms. Images of the chromatograms were also saved as videoscans. The well separated chromatographic bands then underwent mass spectrometric analysis. The results obtained are presented in Figures 1–5. In these figures, multiple fingerprints are presented of the five sage species, each composed of the densitogram and four (*S. lavandulifolia*), or five (*S. staminea*, *S. hians*, *S. triloba*, and *S. nemorosa*) mass spectra of the respective frac-

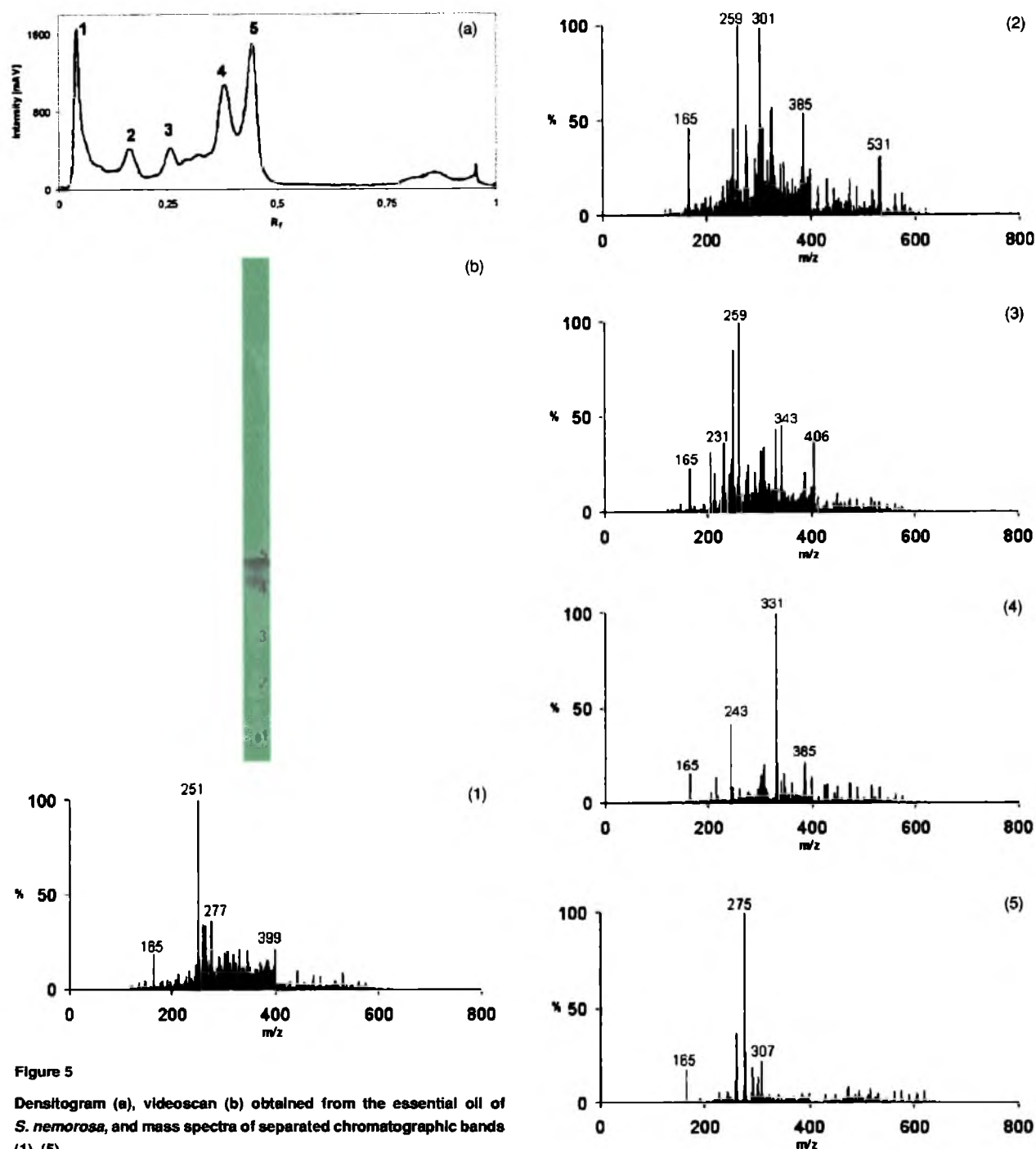


Figure 5

Densitogram (a), videoscan (b) obtained from the essential oil of *S. nemorosa*, and mass spectra of separated chromatographic bands (1)–(5).

tions, which are marked with numerals on the densitograms and the videoscans. From visual inspection of the densitograms and the mass spectra it is clearly apparent that the species belonging to the *Salvia* genus differ substantially in respect of their fingerprints and hence, their chemical composition also.

An interesting feature characterizes individual sets of mass spectra recorded for the different sage species. It is readily apparent that the mass spectra of the fractions with the highest  $R_f$  value (i.e., the fraction 5 in Figures 2–5) furnish much simpler fingerprints than those closer to the origin. In Figure 1 (*S. lavandulifolia*), this regularity was not observed though,

because mass spectrum no. 4 was recorded for the sum of the two rather poorly separated fractions. Reproducibility of this characteristic pattern has been confirmed by multiple repetition of the TLC-MS analysis. This shows that each essential oil contains greater amounts of high-polarity compounds (e.g., terpenoids), which are more strongly retained in adsorption chromatography, thus yielding lower  $R_f$  values, than of low-polarity compounds (e.g., terpenes). It is also possible that the low-polarity components of the oils (represented by peak 5 in Figures 2–5) are less strongly adsorbed by the silica gel layer and, hence, at ambient temperature partially evaporate or sublime

from the plate before elution of the chromatographic bands and recording of the MS fingerprints. Finally, it must be added that although the predominant signals in the mass spectra shown in Figures 1–5 are labeled with the respective  $m/z$  values, this has been done for general orientation of the reader rather than for identification purposes (which was not the objective of this study).

In contrast with the separation performance of GC, TLC in most cases cannot achieve resolution of individual species from complex mixtures and, hence, attempts to identify such species by use of external standards seem rather futile. This evident bottleneck of TLC is made even more acute by the isomerism of many terpenes (which to a large extent constitute essential oils). Isomeric terpenes (for example the pairs  $\alpha$  and  $\beta$ -phellandrene, caryophyllene/isocaryophyllene, and  $\alpha$  and  $\beta$ -chamigrene) have identical molecular weights and similar chemical structures. In these circumstances, the diversity of mass spectra obtained from each separated fraction derived from a given essential oil and, simultaneously, the repeatability thereof is a real bonus. In that way the uniqueness of each fraction is strongly emphasized.

However, visual inspection alone can be regarded as a preliminary step only toward differentiation of the plant species on the basis of their fingerprints. From multiple fingerprints (i.e. those comprising densitograms and mass spectra), it is evident that the wealth of relevant information encoded in each individual fingerprint largely escapes visual inspection and, hence, is lost for analytical purposes. Effective extraction of this information can be achieved by use of chemometric approaches, as we demonstrated elsewhere for the different sage species [12]. In that paper, exhaustive information was provided about the strategies used for preprocessing instrumental signals (i.e., chromatographic fingerprints), followed by exploration of the differences among them (e.g., by means of principal-components analysis, PCA). Such chemometrically based analysis of differences among the plant species can be regarded as an advanced approach to chemotaxonomic research. In future studies, therefore, we will make use of multiple fingerprints (comprising densitograms and mass spectra) of the essential oils of the different sage species to perform chemometric differentiation among them.

## 4 Conclusion

Basic conclusions from the results presented in this study can be formulated as follows:

- (a) Low-temperature thin-layer chromatography of volatile essential oils provides reproducible planar separations that can further be analyzed by mass spectrometry.
- (b) Even in an absence of GC–MS system (which is preferably dedicated to the analysis of the volatile compounds), mass spectrometry can be used for fingerprinting (and, in favorable circumstances, identification also) of essential oil components by use of TLC and the MS interface.
- (c) Thin-layer chromatographic fractionation of essential oils followed by mass spectrometry of the separated fractions provides multiple fingerprints that can better characterize an analyzed sample than the single (e.g., densitometric) fingerprints.
- (d) Fingerprinting of the essential oil fractions is particularly helpful because of the presence of many isomeric terpenes (e.g. the pairs  $\alpha$  and  $\beta$ -phellandrene, caryophyllene/isocaryophyllene, and  $\alpha$  and  $\beta$ -chamigrene) with identical molecular weights and very similar structures which can neither be effectively separated by TLC nor identified by use of external standards.
- (e) Multiple fingerprints of plant material provide multidimensional quantitative characteristics that can further prove useful in chemotaxonomic research supported by chemometric approaches.

## Acknowledgments

The work of one author (Ł.W.) was partially supported by a PhD scholarship granted to him in 2009 within the framework of the ‘University as a Partner of the Economy Based on Science’ (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union. The authors wish to express their gratitude to Mrs Małgorzata Zych from Donau Lab Sp. Z o.o. (Polish representative of the firm CAMAG) for kindly lending them the CAMAG TLC–MS interface and in that way enabling this research.

## References

- [1] M. Sajewicz, T. Kowalska, *Acta Chromatogr.* **22** (2010) (to appear in issue no. 4).
- [2] A. Koch, S. Basar, R. Richter, in: T. Kowalska, J. Sherma (eds.), *Preparative Layer Chromatography*, Vol. 95 of the *Chromatographic Science Series*, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 391–412.
- [3] S. Basar, *Phytochemical Investigations on Boswellia Species*, PhD Dissertation, University of Hamburg, Hamburg, 2005.
- [4] A. Koch, S. Basar, R. Richter, in: M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska (eds.), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, Vol. 99 of the *Chromatographic Science Series*, CRC Press, Boca Raton, 2008, pp. 451–480.
- [5] M. Sajewicz, Ł. Wojtal, D. Staszek, M. Hajnos, M. Waksmundzka-Hajnos, T. Kowalska, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. **33** (2010) 936–947.
- [6] G. Morlock, Y. Ueda, *J. Chromatogr. A* **1143** (2007) 243–251.
- [7] G. Morlock, E. Dytkeiwitz, *J. AOAC Int.* **91** (2008) 1237–1244.
- [8] G. Morlock, U. Jautz, *J. Planar Chromatogr.* **21** (2008) 367–371.
- [9] *Polish Pharmacopoeia VI*, Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, 2002.
- [10] J. Rzepa, Ł. Wojtal, D. Staszek, G. Grygierczyk, K. Labe, M. Hajnos, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. Sci.* **47** (2009) 575–580.
- [11] M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, Ł. Wojtal, D. Staszek, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, *Acta Chromatogr.* **21** (2009) 453–471.
- [12] M. Daszykowski, M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, D. Staszek, Ł. Wojtal, T. Kowalska, M. Waksmundzka-Hajnos, B. Walczak, *Acta Chromatogr.* **21** (2009) 513–530.

Ms received: December 2, 2009

Accepted: March 16, 2010

## Short Communication

# Exploration of the Possibility of Combined HS–GC–MS and $^{13}\text{C}$ NMR Spectroscopic Investigation of the Composition of the Essential Oils of Selected Sage (*Salvia*) Species

M. SAJEWICZ<sup>1</sup>, M. MATLENGIEWICZ<sup>1,2</sup>, J. RZEPA<sup>1</sup>, Ł. WOJTAL<sup>1</sup>, M. HAJNOS<sup>3</sup>,  
M. WAKSMUNDZKA-HAJNOS<sup>4</sup>, AND T. KOWALSKA<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

<sup>2</sup>Polish Academy of Sciences, Centre of Polymer and Carbon Materials,  
5 Sowińskiego Street, 44-121 Gliwice, Poland

<sup>3</sup>Department of Pharmacognosy, Medical University of Lublin,  
1 Chodźki Street, 20-093 Lublin, Poland

<sup>4</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin,  
6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland

E-mail: teresa.kowalska@us.edu.pl

**Summary.** The objective of this study was to explore the possibility of combining headspace gas chromatography with mass spectrometric detection (HS–GC–MS) and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy to enhance the detectability of components of the essential oils of medicinal plants of the *Salvia* genus. Preliminary investigations were performed with two sage species, *Salvia lavandulifolia* and *Salvia triloba*, known for particularly abundant yields of their respective essential oils. By use of HS–GC–MS, characteristic fingerprints of the volatile fractions were obtained for plant species from two different vegetation seasons (2007 and 2008). Partial identification of the components of these volatile fractions was performed, and comparison of the chromatographic fingerprints confirmed seasonal fingerprint similarity within the same species. Preliminary  $^{13}\text{C}$  NMR measurements resulted in well shaped spectra with an abundance of regularly distributed signals. This suggested the possibility of using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy in phytochemical research, in parallel with HS–GC–MS, to enhance the detectability of volatile components of plant species belonging to this genus.

**Key Words:** essential oils, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia triloba*, headspace–gas chromatography–mass spectrometry,  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy

## Introduction

The health benefits of sage (*Salvia*) essential oils can be attributed to a wide spectrum of curative properties of species belonging to this genus, in particular their antifungal [1], antimicrobial [2], antioxidant, antiseptic, anti-inflammatory, antispasmodic, antibacterial, cholagogue, cholaretic, cicatri-



sant, depurative, digestive, disinfectant, emenagogue, expectorant, febrifuge, laxative, and stimulant [3] properties. An antimutagenic effect of some essential oils from sage has also been reported [4]. Internal use of these essential oils can, however, be harmful, because of neurotoxicity related to substantial levels of thujone (which should be monitored in pharmaceuticals containing sage or in essential oils from sage). The essential oil from sage is usually applied externally, and is an important ingredient in the perfume and cosmetics industries (particularly in skin care). Consequently, innumerable beauty treatment products claim to contain sage oil. The oil is, moreover, widely used in aromatherapy and as a natural insect repellent.

Another application of sage is in food processing and cuisine. Sage has been widely used, with rosemary and thyme, to preserve numerous foods, including meats and cheeses. The dried leaves and essential oil of sage are used for seasoning sausages, ground meats, meat stuffing, fish, honey, salads, soups, and stews. Sage can also be used as a flavouring agent and antioxidant in cheeses, pickles, vegetables, processed foods, and beverages, and its essential oil is used to extend the shelf life of fats and meats. Sage can be purchased as the whole leaf or ground, rubbed, sliced, or cut. The essential oils of some sage species can even be obtained commercially.

Gas chromatography is the analytical technique of first choice most widely used for investigation of the components of essential oils. Headspace extraction and mass spectrometric detection (HS-GC-MS) are recommended for isolation and identification of these volatile compounds. Identification of the volatile plant components used to be a tedious task, however, basically because of the never exhausted ingenuity of Nature combined with the high cost of commercial phytochemical standards. In numerous cases, even additional support of identification by use of a library of mass spectral proves insufficient and, hence, many essential oil constituents remain unidentified. This is the main reason why fingerprinting of the different fractions derived from the plants is still a very popular phytochemical approach, applied in botany for comparison of the different species belonging to the same genus, and in pharmacognosy for assessment of crude medicinal plant material, etc.

Despite the great popularity of plants of the *Salvia* genus in traditional medicine and in much other human activity, their chemical composition has not yet been sufficiently explored. It is well known that  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy has proved a well performing analytical tool in the analysis of complex organic mixtures, including those from botanical sources [5–11]. The objective of this study was, therefore, to demonstrate the usefulness of joint application of HS-GC-MS and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy to the analysis of the volatile fractions of two different *Salvia* species, *S. lavandulifolia* and *S. triloba*.



## Experimental

### Plant Material

Samples of the two *Salvia* species (*S. lavandulifolia* and *S. triloba*) investigated in this study were collected in the Pharmacognosy Garden of the Medical University (Lublin, Poland) in the vegetation periods of 2007 and 2008. These *Salvia* species are typical of the temperate climatic zone and are used for diverse purposes. Moreover, both furnish high yields of essential oils, largely composed of terpenes and terpenoids. Because the objective of this study was to enhance the method of first choice for investigation of essential oils from the *Salvia* genus (i.e., HS-GC-MS) by applying  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, the choice of the essential-oil rich *S. lavandulifolia* and *S. triloba* can be regarded as particularly appropriate. Botany specialists identified both species, and voucher specimens were deposited in the herbarium of the Department of Pharmacognosy, Medical University (Lublin, Poland).

Plant material was dried at 35 to 40°C for 40 h in an oven with a forced air flow and the dry material obtained was stored in a refrigerator until analysis. Each plant species was weighed and 1-g samples were powdered in a porcelain mortar then placed in 10-mL glass vials stoppered with a silicone rubber-Teflon septum. Three replicates of each sample were processed identically by HS-GC-MS.

### Headspace Gas Chromatography-Mass Spectrometry (HS-GC-MS)

Headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) was performed with a Trace 2000 GC and MS Trace mass detector (ThermoQuest, Waltham, MA, USA) equipped with a CTC Analytics autosampler (Combi PAL, Basel, Switzerland) used in headspace mode. Temperature and time of headspace desorption were 70°C and 15 min, respectively. Headspace (0.5 mL) was introduced into a 30 m  $\times$  0.25 mm i.d. capillary column coated with a 0.25- $\mu\text{m}$  film of DB-5 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Helium ( $p = 100$  kPa) was used as carrier gas. The column temperature was held at 40°C for 3 min then programmed at 8° min $^{-1}$  to 150°C which was held for 15 min. The injector temperature was 150°C. The mass spectrometer was fitted with an EI source operated at 70 eV. Identification of individual headspace components was based on comparison of their mass spectra with those obtained from standards and those in the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA) software library. Retention times of components of the *Salvia* samples were also compared with those

of known components of pine oil, peppermint oil, eucalyptus oil, and juniper oil, used as volatile standards (Apotheca Pacis, Rybnik, Poland). The compounds identified are listed in Table I.

Table I. Volatile compounds identified in the sage species *S. lavandulifolia* and *S. triloba*, and their respective chemical structures

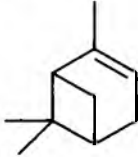
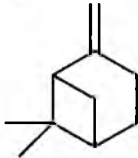
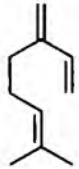
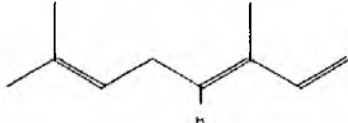

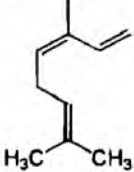

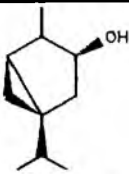
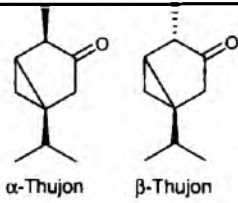

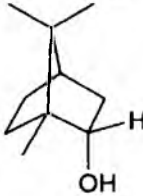
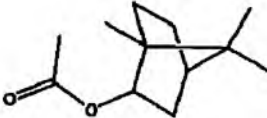
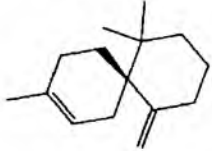
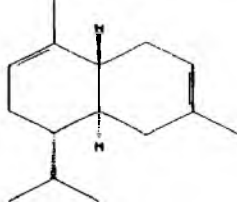
No.	Compound	Molecular structure
1	$\alpha$ -Pinene	
2	$\beta$ -Pinene	
3	$\beta$ -Myrcene	
4	$\beta$ - <i>trans</i> -Ocimene	
5	Eucalyptol	
6	<i>cis</i> -Ocimene	
7	<i>p</i> -Mentha-1,4 diene	

Table I. (continued)

No.	Compound	Molecular structure
8	Thujol	
9	Thujone	
10	Camphor	
11	Borneol	
12	Bornyl acetate	
13	β-Chamigrene	
14	Cadina-3,9-diene	

## Vapour Distillation in the Deryng Apparatus

Dried plant material (50 g) from the 2008 vegetation season was placed in a round-bottomed flask and 400 mL water was added. Vapour distillation was performed for 3 h by use of the Deryng apparatus, as described in the Polish Pharmacopoeia VI [12]. Again, three replicates of each sample were processed identically and the distillates were analyzed by  $^{13}\text{C}$  NMR spectrometry.

## $^{13}\text{C}$ NMR Spectroscopy

$^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded with Bruker instruments working at 100 MHz (Avance UltraShield) and 150 MHz (Avance II UltraShield Plus), using power-gated proton decoupling. Samples were dissolved in  $\text{CDCl}_3$  to furnish approx. 10% (*v/v*) solutions and TMS was used as an internal reference. For real mixtures of the natural products twenty-thousand scans were found adequate to reveal the presence of a dozen principal components, but increasing the number of scans even to forty-thousand was very rewarding and revealed many more compounds present at much lower concentrations. The spectra of individual compounds and of their synthetic mixtures, recorded to acquire their spectral data, were satisfactory after 2500 scans.

## Results and Discussion

### Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry (HS–GC–MS)

It is apparent from the results listed in *Table 1* (and from our earlier investigations [13, 14] of twenty different sage species) that fourteen different volatile compounds were identified in the two sage species discussed in this study. It had, moreover, previously been established [13] that  $\beta$ -myrcene can be regarded as a chemotaxonomic marker of *S. lavandulifolia*, and  $\beta$ -*trans*-ocimene and thujone can be regarded as chemotaxonomic advice compounds. Only thujone can be regarded as chemotaxonomic advice constituent for *S. triloba*.

Chromatograms obtained from the volatile compounds isolated from *S. lavandulifolia* and *S. triloba* from two different vegetation seasons are presented in *Fig. 1*. Visual inspection of these chromatograms reveals striking qualitative similarity between the volatile fractions obtained from the same species, irrespective of vegetation season, yet differences between the chromatographic fingerprints from the two different *Salvia* species are also evident.

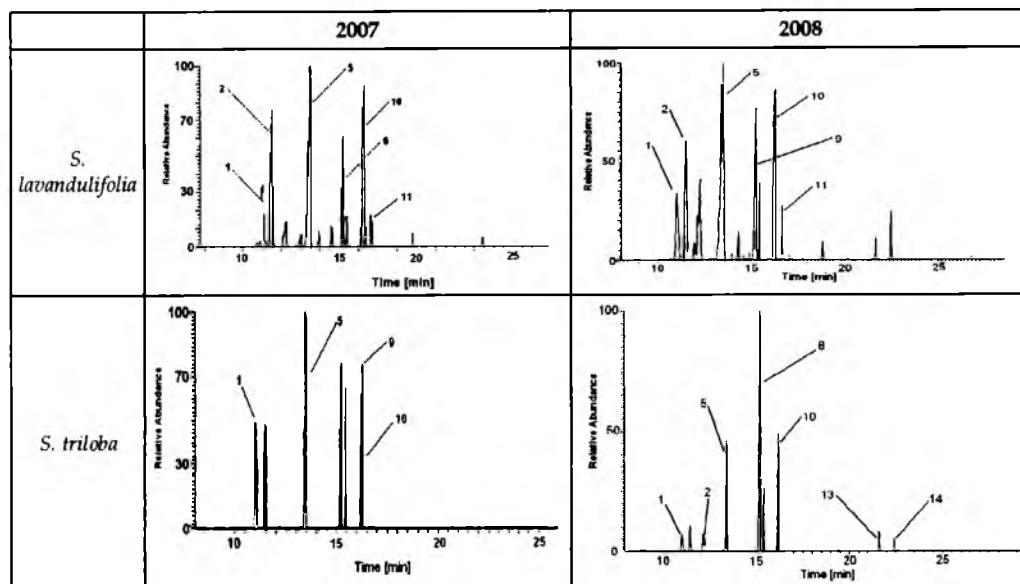


Fig. 1. Fingerprint gas chromatograms obtained from HS-GC-MS analysis of the volatile fractions of *S. lavandulifolia* and *S. triloba*. Selected (i.e., most abundant and/or best separated) peaks are labelled in accordance with the numbering in Table I

### <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy

The 100 MHz <sup>13</sup>C NMR spectrum obtained from the volatile compounds isolated from *S. triloba* is shown in Fig. 2. The main aliphatic part (Fig. 2a) ranges from 8 to 48 ppm, with some lines between 55 and 58.5 ppm. Several distinct lines are present in the region from 99 to 127 ppm (Fig. 2b) and three further lines are also observed between 140 and 150 ppm. This part of spectrum is typical of aromatic carbon, but in this mixture of essential oils the lines arise, respectively, from olefinic and quaternary carbons in cyclic or unsaturated environments.

To observe the increase in resolution, the <sup>13</sup>C NMR spectrum of the volatile compounds derived from *S. lavandulifolia* was recorded at 150 MHz with forty-thousand scans; the spectrum is shown in Fig. 3. Now, the aliphatic region of the spectrum (Fig. 3a), and the olefinic and quaternary regions (Fig. 3b), are nearly evenly covered with fine signals indicating the presence of a rich variety of products in a broad range of concentrations. Expansion of a portion of an aliphatic region of the 150 MHz <sup>13</sup>C NMR spectrum (Fig. 4) reveals excellent resolution of single lines, indicating the possibility of identification of individual products in the mixture. The spectrum recorded for *S. lavandulifolia* at 150 MHz has many features comparable with those for *S. triloba* recorded at 100 MHz, and the differences are mainly

because of minor components. It is therefore evident that application of a higher magnetic field and increasing the number of scans are crucial in the analysis of the minor components of these essential oils.

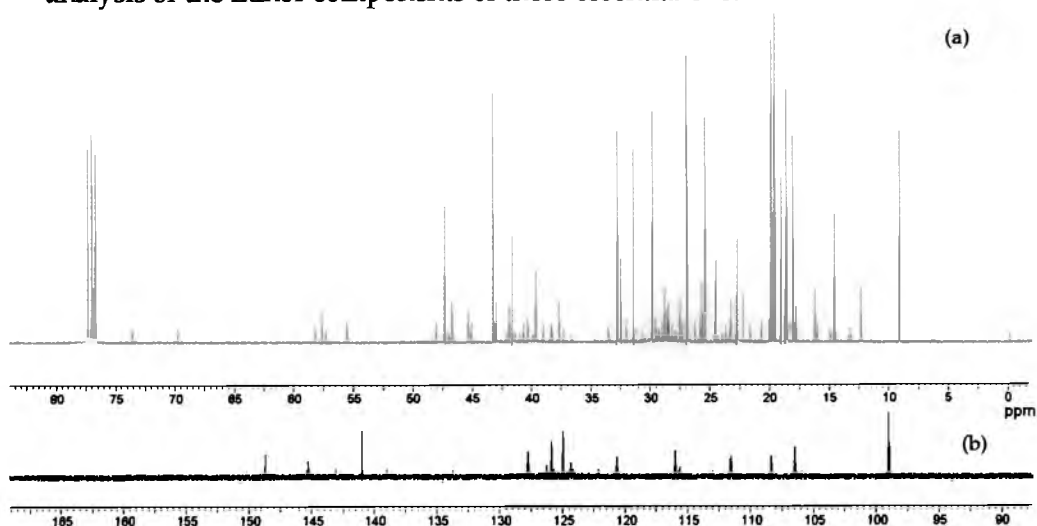


Fig. 2. 100 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of *S. triloba* in  $\text{CDCl}_3$  showing the aliphatic (a), and olefinic and aromatic (b) regions

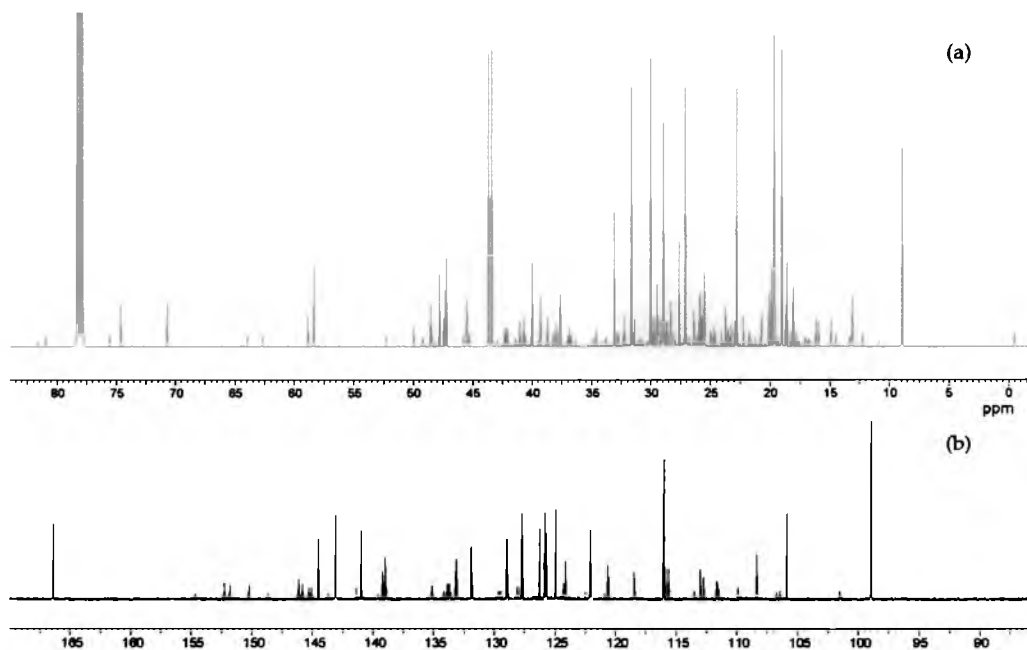


Fig. 3. 150 MHz  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of *S. lavandulifolia* in  $\text{CDCl}_3$  showing the aliphatic (a), and olefinic and aromatic (b) regions

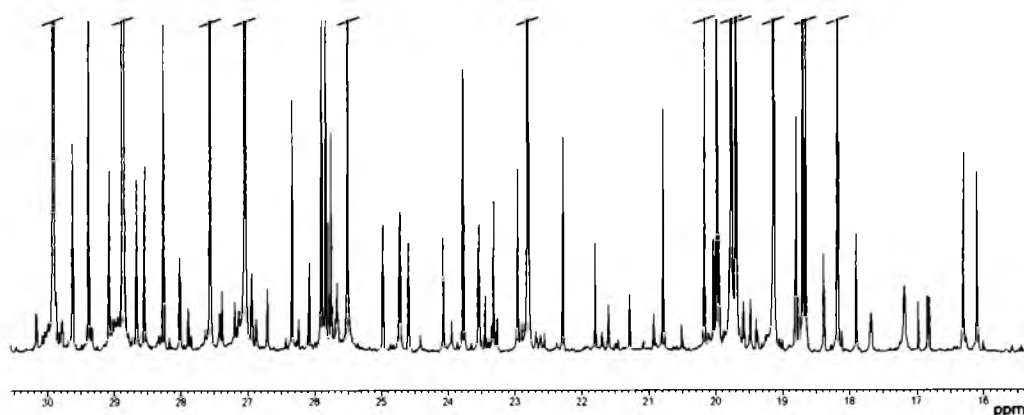


Fig. 4. 150 MHz <sup>13</sup>C NMR spectrum of *S. lavandulifolia* in CDCl<sub>3</sub>. Expanded aliphatic region from 15 to 30 ppm

For a relatively low concentration of particular components of the mixture and using a non-polar solvent for NMR measurements to avoid molecular interactions, the chemical shifts determined for the pure products are sufficiently stable and reproducible to be used to pinpoint the separate lines in the mixture. Analyses based on this principle have been conducted for mixtures of hydrocarbons [15], and it was shown by Casanova et al. [16] that such an approach is also possible for the analysis of essential oils. It is, therefore, necessary to collect a library of spectra of the pure compounds and to analyse a mixture by comparison of the chemical shifts and relative intensities determined for the pure compounds with the respective lines for these compounds present in the mixtures. To collect these spectral data the spectra of the individual compounds or their simple synthetic mixtures may be recorded under much less severe conditions. It is, therefore, the objective of our work to perform such an analysis for the essential oils present in the *Salvia* species. Recording of representative individual spectra of compounds present in these essential oils is in progress.

## Acknowledgments

The work of one author (Ł. W.) was partially supported by a PhD scholarship granted to him in 2008 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union.

## References

- [1] M.E. Guynot, S. Martin, L. Seto, V. Sanchis, and A.J. Ramos, *Food Sci. Technol.*, **11**, 25–32 (2005)
- [2] D. Miladinović and Lj. Miladinović, **2**, 97–100 (2000)
- [3] Z. Popović, M. Kostić, S. Popović, and S. Skorić, *Biotechnol. Biotechnol. Eq.*, **20**, 36–40 (2006)
- [4] J. Knežević-Vukčević, B. Vuković-Gačić, T. Stević, J. Stanojević, B. Nikolić, and D. Simić, *Arch. Biol. Sci. (Belgrade)*, **57**, 163–172 (2006)
- [5] P. Bradesi, A. Bighelli, F. Tomi, and J. Casanova, *Can. J. Appl. Spectrosc.*, **41**, 15–24 (1996)
- [6] P. Bradesi, A. Bighelli, F. Tomi, and J. Casanova, *Can. J. Appl. Spectrosc.*, **41**, 41–50 (1996)
- [7] M.-L. Lota, D. de Rocca Serra, F. Tomi, and J. Casanova, *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 77–104 (2001)
- [8] S. Rezzi, C. Cavaleiro, A. Bighelli, L. Salgueiro, A. Proença da Cunha, and J. Casanova, *Biochem. Syst. Ecol.*, **29**, 179–188 (2001)
- [9] B. Ferrari, F. Tomi, and J. Casanova, *Biochem. Syst. Ecol.*, **33**, 445–449 (2005)
- [10] J.B. Boti, A. Muselli, F. Tomi, G. Koukoua, T.Y. N'Guessan, J. Costa, and J. Casanova, *C.R. Chimie*, **9**, 164–168 (2006)
- [11] K. Liu, P.-G. Rossi, B. Ferrari, L. Berti, J. Casanova, and F. Tomi, *Phytochemistry*, **68**, 1698–1705 (2007)
- [12] Polish Pharmacopoeia VI, Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, 2002
- [13] J. Rzepa, Ł. Wojtal, D. Staszek, G. Grygierczyk, K. Labe, M. Hajnos, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 575–580 (2009)
- [14] M. Sajewicz, J. Rzepa, M. Hajnos, Ł. Wojtal, D. Staszek, T. Kowalska, and M. Waksmundzka-Hajnos, *Acta Chromatogr.*, **21**, 453–471 (2009)
- [15] M. Matlengiewicz, N. Henzel, D. Czachowska, F. Schmit-Quiles, D. Nicole, and J. C. Lauer, *Fuel*, **73**, 843 (1994A)
- [16] A. Bighelli and J. Casanova, in: A. Akhila (ed), *Essential Oil-Bearing Grasses*, CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, 2010, p. 200

Accepted by TK



## TLC-MS VERSUS TLC-LC-MS FINGERPRINTS OF HERBAL EXTRACTS. PART I. ESSENTIAL OILS

Mieczysław Sajewicz<sup>1</sup>, Łukasz Wojtal<sup>1</sup>, Maja Natić<sup>1,2</sup>, Dorota Staszek<sup>1</sup>, Monika Waksmundzka-Hajnos<sup>3</sup>, and Teresa Kowalska<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland

<sup>2</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski Trg 12-16, 11000 Belgrade, Serbia

<sup>3</sup>Department of Inorganic Chemistry, Medical University of Lublin, 6 Staszica Street, 20-081 Lublin, Poland

**Abstract:** In our earlier studies, we proposed the low-temperature thin-layer chromatography with densitometric and mass spectrometric detection (LT TLC-densitometry and LT TLC-MS, respectively) for fingerprinting of essential oils derived from several different species from the sage (*Salvia*) genus (and more generally, for fingerprinting of the complex mixtures of organic compounds of the natural, or synthetic origin). Development of the proposed LT-TLC-MS approach was only possible with use of the TLC-MS interface able to couple the developed chromatographic plate with mass spectrometer. The goal of this study was to develop for the same purpose the two-dimensional liquid chromatographic system and to examine its performance with the sage sample. Development of such a system was only possible with use of the TLC-MS interface and it included the low-temperature thin-layer chromatography coupled off-line with high-performance liquid chromatography, to build an overall LT TLC-LC-MS system. We compared the fingerprinting results for the essential oil of the test plant (*Salvia lavandulifolia*) obtained with use of the earlier proposed one-dimensional system (1D LT TLC-MS) and the results obtained with use of the two-dimensional system (2D LT TLC-LC-MS), newly proposed in this study. It was shown that the 2D approach to the separation of a complex mixture of botanical origin provides more fingerprints for further investigations than the 1D approach. Moreover, it is also clear that the 2D approach is better suited for identification of individual chemical species contained in a given mixture, due to the simpler patterns of mass spectra obtained from the 2D analytical mode than from the 1D one. However, with the constituents of the essential oil derived from *Salvia lavandulifolia*, a straightforward identification was not possible, basically due to

numerous groups of isomers among the terpenes and terpenoids contained in the examined sample that have the same molecular weights and hence, can give identical  $m/z$  signals.

**Keywords:** *Salvia* spp., essential oils, low-temperature TLC-MS, low-temperature TLC-LC-MS, mass spectrometric fingerprinting

Correspondence: Teresa Kowalska, Institute of Chemistry, University of Silesia, 9 Szkolna Street, 40-006 Katowice, Poland. E-mail: [teresa.kowalska@us.edu.pl](mailto:teresa.kowalska@us.edu.pl)

## INTRODUCTION

In our earlier study [1], we were the first to propose the one-dimensional (1D) low-temperature thin-layer chromatography (LT TLC) to investigating the volatile fraction derived from the plant species belonging to the sage (*Salvia* L.) genus. Low temperature of running the thin-layer chromatographic separation with volatile compounds derived from botanical material was first introduced in paper [2] and we consider it as a convenient alternative for the well established and the essential-oils-oriented methodology, based on gas chromatography (GC). Satisfactory performance and a variety of additional advantages of LT TLC have later been discussed in the book chapter by Koch et al. [3] and in the references contained therein. As an indisputable advantage of the LT TLC approach, we consider its simplicity and flexibility, enabling an easy fingerprinting of botanical material for various different purposes, perhaps one of the most important being identification and quality assurance operations, when handling commercial batches of medicinal plants traded in powdered form.

Owing to a relatively recent introduction by CAMAG (Muttens, Switzerland) of the TLC-MS interface, a possibility emerged to easily apply mass spectrometric detection to planar chromatography. This possibility was convincingly presented in publications by Morlock et al. (e.g., in [4-7]).

In publication [8], we presented a possibility of simultaneously using the LT TLC-densitometry and LT TLC-MS systems to obtain the binary fingerprints with the different sage (*Salvia*) species, applying these two detectors (i.e., densitometric and mass

spectrometric) in parallel. The obtained instrumental signals can further be evaluated and compared (e.g., for chemotaxonomic, quality assurance, or other purposes) with use of chemometric techniques, as it was indicated, e.g., in paper [9].

The aim of this study was to repeatedly apply the one-dimensional system (1D LT TLC-MS) to the analysis of the essential oil derived from *Salvia lavandulifolia* and to compare the obtained results with those originating from a two-dimensional liquid chromatographic system making use of the TLC-MS interface, and proposed for the first time in this study (2D LT TLC-LC-MS). In order to circumvent the necessity of using gradient modes of the gas chromatographic or high-performance liquid chromatographic separation of a complex mixture, we proposed the preliminary thin-layer chromatographic group separation of such a mixture with the LT TLC system coupled off-line through the TLC-MS interface with the high-performance liquid chromatograph equipped with mass spectrometric detector. In that way, we managed to propose a new 2D LT TLC-LC-MS system and on the selected example of the essential oil derived from the *Salvia lavandulifolia* species, we compared its performance with that of the simpler 1D LT TLC-MS system. The choice of *Salvia lavandulifolia* in this study was due to the recognized curative performance of the plants originating from the *Salvia* genus, and also due to the high yields of essential oil which can be derived from this particular species.

## EXPERIMENTAL

### Materials and Reagents

Sample of the *Salvia lavandulifolia* species was harvested in the Pharmacognosy Garden of the Medical University, Lublin, Poland, on August 20th, 2007. The plant material comprised all parts of the plant (i.e., roots and the aerial parts) and it was dried for 40 h in an oven with a forced air flow at 35 to 40°C. Then the obtained dry material was stored in the deep-freeze compartment of refrigerator until the commencement of the analysis. Finally, 50 g of the plant material was weighed and powdered in a porcelain mortar. Three replicates of the sage sample were processed in an identical way.

Methanol, toluene, and ethyl acetate used for experiments were of analytical purity grade and manufactured by POCh (Gliwice, Poland).

### **Vapor Distillation of Essential Oils from the *Salvia* Species**

Dried plant material (50 g) was placed in a round-bottomed flask and 400 mL water was added. Vapor distillation was conducted for 3 h with use of a Deryng apparatus. The procedure is described in Polish Pharmacopoeia VI [10] and it has proved more effective than traditional solvent extraction and accelerated solvent extraction (ASE) for this particular purpose, as documented in our comparative study [11]. Yields of the distilled essential oils in the *S. lavandulifolia* samples were ca. 0.5 mL per 50 g dried plant material (ca. 1%, v/w).

### **Low-Temperature Thin-Layer Chromatography with Densitometric Detection (LT TLC-Densitometry)**

Thin-layer chromatographic separations were performed on commercial glass plates (20 cm × 20 cm) precoated with 0.25mm layers of silica gel 60 F254 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany; cat. no. 1.05715). Essential oil samples originating from vapor distillation were spotted onto the thin layer in the 5-μL aliquot of undiluted sample, using an AS 30 model autosampler (Desaga, Heidelberg, Germany). Development of the chromatograms was carried out at  $-10 \pm 0.5^\circ\text{C}$  (inside the refrigerator), for a distance of 15 cm in the one-dimensional development mode, using the binary mobile phase toluene – ethyl acetate (95:5; v/v) [12]. Chromatograms were developed in sandwich DS chambers (Chromdes, Lublin, Poland), previously saturated with mobile phase vapor for 15 min.

The developed chromatograms were dried for 3 h at ambient air and eventually evaluated by means of densitometry. Acquisition of the densitograms was carried out with a Desaga CD 60 model densitometer equipped with Windows compatible ProQuant software (Desaga). Concentration profiles of the development lanes for the sage samples were recorded in reflected ultraviolet (UV) light from a deuterium lamp at 340 nm. The dimensions of the rectangular light beam were 2.0 mm × 0.1 mm. Each TLC analysis was performed in triplicate. Then the developed and scanned chromatographic plates were carefully wrapped in plastic foil and placed in refrigerator prior to the commencement of the next experimental step, which was either direct analysis of the separated chromatographic bands with use of mass spectrometer (LT TLC-MS), or an indirect analysis of these bands by further separating them with use of high-performance liquid chromatographic system followed by mass spectrometric detection (LT TLC-LC-MS). Placement of the chromatograms in refrigerator

and protecting them by plastic foil was meant to prevent evaporation of the volatile essential oil components from the plates.

Application of LT TLC-densitometry was an indispensable initial step in each of the two novel procedures introduced in this study. Firstly, it enabled group separation of a complex mixture of the volatile compounds contained in the investigated essential oil samples into several less complex mixtures. Secondly, it allowed localization of the separated chromatographic bands on the plate surface, which is particularly important with the colorless analytes. Consequently, positions of individual chromatographic bands could be marked on the adsorbent surface, in that way indicating areas for the consecutive elution with use of the TLC-MS interface.

### **Low-Temperature Thin-Layer Chromatography with Mass Spectrometric Detection (LT TLC-MS)**

The first chromatographic mode assumed in this study consisted in a direct elution of a given band from the chromatographic plate with use of the TLC-MS interface (CAMAG, Muttenz, Switzerland), which enabled an introduction of a given band from the chromatographic plate to mass spectrometer. This mode is referred to as the low-temperature thin-layer chromatography with mass spectrometric detection (LC TLC-MS) and it has been devised to fingerprint the preliminarily fractionated essential oils originating from the dried and powdered sage samples [8].

In this study, elution was carried out at ambient temperature with use of methanol (its flow rate equal to  $0.2 \text{ mL min}^{-1}$ ). The eluate was directly introduced to the Varian 500-MS model mass spectrometer (Varian, Harbor City, CA, USA) and the samples were analyzed in the ESI mode (full ESI-MS scan, positive ionization, spray chamber temperature  $45^{\circ}\text{C}$ , drying gas temperature  $150^{\circ}\text{C}$ , drying gas pressure 25 psi, capillary voltage 70 V, needle voltage 5 kV). Varian MS Workstation v. 6.9.1 software was used for data acquisition and processing.

### **Low-Temperature Thin-Layer Chromatography-Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection (LT TLC-LC-MS)**

The second chromatographic mode is for the first time proposed in this study and it also aims at mass spectrometric fingerprinting of the essential oils derived from the sage species. Owing to the TLC-MS interface, we were able to develop the two-dimensional liquid

chromatography system equipped with mass spectrometric detection, off-line coupling the low-temperature thin-layer chromatographic system with high-performance liquid chromatograph (LT TLC-LC). In this two-dimensional system, the LT TLC part provides preliminary group separation of the essential oil components, with individual separated fractions one by one transported with aid of the TLC-MS interface not directly to mass spectrometer, but to the high-performance liquid chromatographic column first. Eventually, we used mass spectrometer as a detector, to obtain the LT TLC-LC-MS tandem system. However, any other HPLC detector can in fact be used for the analogous purpose as well (e.g., the diode array detector, DAD, the evaporative light scattering detector, ELSD, etc.)

The working conditions of TLC-densitometry and MS employed in this second analytical mode were exactly the same ones as in the earlier described case. Liquid chromatographic analysis with mass spectrometric detection (LC-MS) was carried out using an LC-MS System Varian (Varian, Palo Alto, CA, USA) equipped with a Varian ProStar model pump, Varian 100-MS mass spectrometer, and Varian MS Workstation v. 6.9.1 software for data acquisition and processing.

The LC analyses were carried out in the isocratic mode, using a Pursuit X R<sub>s</sub> 3-C18 column (50 mm × 2.0 mm i.d.; Varian; cat. no. A6001050C020) and methanol as mobile phase at the flow rate of 0.20 mL min<sup>-1</sup>. Mass spectrometric detection and processing of the obtained results were carried out using the same working parameters as those described in the preceding sub-section.

## RESULTS AND DISCUSSION

Composition of essential oils derived from *Salvia lavandulifolia* has been investigated by numerous researchers and research groups [11, 13-24]. The literature survey on this subject resulted in a summary given in Table 1. As it comes out from the data collected therein, a vast number of the different terpenes and terpenoids with molecular weights roughly between 100 and 500 Da has been identified in essential oils originating from *Salvia lavandulifolia* and harvested from the different habitats and in the different vegetation seasons. The molecular weights of compounds found in these essential oils (listed in Table 1) helped to get a somewhat deeper insight in the mass spectra registered in our study for the different fractions of the essential oil derived from *Salvia lavandulifolia* and discussed in the further parts of this section.

## Low-Temperature Thin-Layer Chromatography with Mass Spectrometric Detection (LT TLC-MS)

The results of the 1D LT TLC-MS fingerprinting of the essential oil derived from the herbal sample of *Salvia lavandulifolia* (harvested in 2007) are given in Fig. 1. In Fig. 1(o), we show the densitogram with bands (1)-(3) indicated by the arrows. These three bands were further instrumentally fingerprinted, either directly by means of mass spectrometric detector, or indirectly by means of high-performance liquid chromatograph coupled with mass spectrometric detector.

The results of the direct TLC-MS fingerprinting are shown in the three mass spectra (Figs 1(a)-(c)). With complex mixtures (and essential oils furnish precisely such a mixture), the adsorption TLC can provide preliminary group separation only, dividing all constituents into the groups of similar polarity. In the described case, band 1 contains the constituents with the relatively lowest retardation factor,  $R_F$  (equal to 0.05), and hence with the highest affinity to the adsorbent and most probably, with the highest polarity also. The compounds belonging to band 2 ( $R_F = 0.39$ ) are those of medium affinity to the adsorbent, and the compounds belonging to band 3 ( $R_F = 0.49$ ) are those of the lowest affinity to the adsorbent. However, between bands 2 and 3, a relatively small difference in the respective retardation coefficients is observed ( $\Delta R_{F(3,2)} = 0.10$ ), which suggests that these two fractions are the mixtures of structurally similar compounds, and more precisely, that they both possibly contain different monoterpenes and/or sesquiterpenes rather than terpenoids.

An attempt was made to reflect on structural information contained in the respective mass spectra, additionally taking into the account the literature data on the presence of certain terpenes and terpenoids in *Salvia lavandulifolia* (see Table 1).

Visual inspection of the fingerprints given in Figs 1(a)-(c) allows a conclusion that band 1 represents a more complex mixture of compounds than bands 2 and 3 (even, if we correctly anticipate that many signals present in the three compared spectra do not represent parent ions alone, but they largely result from fragmentation / structural transformation / clustering of the original compounds).

Further, it seems justified to expect that the fraction with the highest affinity to the adsorbent (i.e., band 1) can largely be composed of the polar oxygen-containing monoterpene and sesquiterpene derivatives (i.e., of those with the  $m/z$  signals in the range from 152.23 to 210.31, and higher than 220.34, respectively; see Table 1). The still higher  $m/z$  values in band

1 (i.e., those with  $m/z > 250$ ) can be attributed to somewhat heavier oxygen derivatives of diterpenes and triterpenes. In general, the ions corresponding to certain truncated entities can be recognized in Figs 1(a)-(c) and as an example, one can point out to the  $m/z$  values equal to 60, 121 and 152. These data provide certain information about the chemical nature of the compounds of origin, although they do not suffice for proper identification.

Figs 1(b) and (c) show the mass spectra of the remaining two fractions (2 and 3), with lesser affinity to the adsorbent than fraction 1. Their respective compositions are simpler than that of fraction 1, which can be deduced from the less numerous signals in the former two spectra than in the latter one. Fractions 2 and 3 can largely be the mixtures of some heavier terpenes and some lighter terpenoids. The ions corresponding to certain truncated entities can also be recognized in Figs 1(b) and (c). For example, in Figs 1(b) and (c) we again repeatedly encounter signals with the  $m/z$  values equal to 121.23 and 151.22 (the latter one being the predominant signal in fractions (b) and (c)), although in these cases, the compounds of origin most probably differ from those giving rise to the identical mass values in Fig. 1(a).

### **Low-Temperature Thin-Layer Chromatography-Liquid Chromatography with Mass Spectrometric Detection (LT TLC-LC-MS)**

Indirect mass spectrometric fingerprinting of the essential oil fractions preliminarily separated by means of TLC (see bands (1)-(3) in Fig. 1(o)) was carried out with use of high-performance liquid chromatograph coupled with mass spectrometric detector. Each band was eluted by means of the TLC-MS interface to the high-performance liquid chromatographic system and further its constituents underwent the second-step separation on the HPLC column. As the essential oils originating from the *Salvia* genus (and more specifically, from *Salvia lavandulifolia*) contain many terpenes and terpenoids, one can expect groups of isomers among them, which cannot easily be separated with use of a universal (i.e., a non-specific) liquid chromatographic system and which, moreover, furnish identical  $m/z$  values for the ions derived from one and the same group of isomers. Consequently, even using the 2D LT TLC-LC-MS system to the fingerprinting of the investigated essential oils, one cannot expect full separation of the compounds contained in bands (1)-(3) from the densitogram (Fig. 1(o)) to the individual chemical species, but further fractionation to the chemically closer related sub-groups only.

In Figs 2-4, we showed the fingerprinting results obtained with use of the 2D LT TLC-LC-MS system for the mixtures of compounds contained in bands (1)-(3), respectively,



preliminarily separated by means of LT TLC (see Fig. 1(o)). Each of these three figures shows the liquid chromatogram registered in the positive ionization mode, with the separated chromatographic bands indicated on it with numerals (1)-(4) (Figs 2 and 3), or (1)-(3) (Fig. 4). For each of these separated bands the respective mass spectra were registered, which are shown in Figs 2(a)-(d), 3(a)-(d), and 4(a)-(c).

The employed LT TLC-LC-MS system couples together the normal phase thin layer chromatographic mode (executed on the silica gel layer) with the classical reversed phase liquid chromatographic mode (performed with use of the C18 column). The sum of the separated chromatographic bands shown in Figs 2(o)-4(o) is higher than that shown in the densitogram (see Fig. 1(o)). In Figs 2(o)-4(o), we can see liquid chromatograms of fractions 1-3, sequentially eluted by means of the TLC-MS interface from the chromatographic plate to the 2D analytical system (see Fig. 1(o)). According to the reversed-phase retention mechanism, the second-step fractionation on the liquid chromatographic column results in the diminishing polarity sequence of the secondarily subdivided fractions (i.e., of fractions 1-4 in Figs 2 and 3, and fractions 1-3 in Fig. 4). Thus, the application of the 2D LT TLC-LC-MS system provides more accurate information about composition of a complex mixture than the 1D LT TLC-MS system. However, the results obtained for the investigated *Salvia lavandulifolia* sample can again be considered as the more refined fingerprints only, especially if considered in an absence of the standard compounds (which often is a sufficient enough goal in phytochemical research though).

If we take a more accurate view of the mass spectra shown in Figs 2(a)-(d), 3(a)-(d), and 4(a)-(c)), then we will notice the presence of certain signals which are characteristic of practically all spectra originating from the 2D LT TLC-LC-MS mode and which are absent from the 1D LT TLC-MS mode spectra (Figs 1(a)-(c)). Most probably, these signals can be related to the isoprene unit and their respective  $m/z$  values equal to 71, 87, 89, and 126. These signals can probably be attributed to the  $[C_5H_8 + H + He]^+$ ,  $[C_5H_8 + H_2O + H]^+$ ,  $[C_5H_8 + H_2O + H + He]^+$ ,  $[C_5H_8 + H + He + MeOH]^+$  ions, respectively. From this observation, a conclusion can be drawn that the 2D technique applied to essential oils seems more destructive than the 1D technique.

As it comes out from the literature [24], essential oils originating from the *Salvia* genus are relatively rich in diterpenoids of the abietane type, with the respective molecular weights contained within the range from 240 to 344 Da (the latter molecular weight valid for galdosol), and in triterpenoids, with the respective molecular weights contained within the range from 427 to 473 Da. Thus it can be anticipated that the numerous signals present in the

discussed mass spectra originate from fragmentation of these heavier fractions. Further, one can speculate that the signal at  $m/z = 316$  (present in Figs 2(b), 3(d) and 4(c)) can be attributed to the fragmentation of galdosol (see the  $[344 - \text{CO}]^+$  or  $[344 + \text{He} - 2\text{CH}_3]^+$  ions), and similarly, the signal at  $m/z = 350$  (present in Figs 2(c) and 4(c)) can also be attributed to galdosol ( $[344 + \text{H} + \text{He} + \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3]^+$ ). In most spectra, the signal at  $m/z = 305$  is repeatedly observed (see Figs 2(a), (c), (b), Figs 3(a), (d) and Figs 4(a), (c)) and it can probably be attributed to the  $[350 - 3 \text{CH}_3]^+$  or  $[350 - 2\text{-propyl} - \text{He}]^+$  ions. It is also possible that the signals at  $m/z = 302$  and  $305$  (present in the majority of the mass spectra) originate from certain abietane type compounds that are commonly met in *Salvia*.

Many terpenes can furnish very similar mass spectra as a result of structural similarity thereof and hence, of similar fragmentation patterns and similar rearrangements also, as a result of ionization. Consequently, identification of terpenes based on the mass spectra alone cannot be very conclusive, and especially not in the case of complex mixtures. As direct recognition of individual parent ions is hardly possible with a complex mixture of the essential oil components, one can only attempt to identify certain molecular fragments by very simple mass subtractions, although even with this rather cautious approach, a wide variety of numerical combination exists and remains unsolved.

## CONCLUSIONS

Low-temperature thin-layer chromatography (LT TLC) enables an efficient essential oils fractionation, as it was demonstrated upon an example of the essential oil derived from the selected sage species (i.e., *Salvia lavandulifolia*). Separated fractions can be fingerprinted with use of the TLC-MS interface to give collective mass spectra of the obtained fractions. However, identification of individual compounds upon these fingerprints which are valid for the still relatively complex mixtures of structurally related compounds (mainly terpenes and terpenoids, and many of them appearing in several isomeric forms) is very difficult. To partially alleviate an identification problem with complex mixtures of natural origin, a novel two-dimensional chromatographic system was proposed, composed of LT TLC coupled off-line with high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection (2D LT TLC-LC-MS). In that way, a two-step fractionation of a complex mixture is possible and mass spectra recorded for the bands separated with use of the liquid chromatographic column are more informative than those originating from the 1D LT TLC-MS system. Upon the example of *Salvia lavandulifolia* presented in this study, a rough assessment of its essential

oil's qualitative composition was demonstrated and it was shown that the components of the investigated essential oil can belong to the classes of mono-, sesqui-, di-, and triterpenes, and also their derivatives (which remains in good agreement with the general knowledge available from the literature). Finally, it can be added that the mass spectrometric fingerprints originating from 1D LT TLC-MS or 2D LT TLC-LC-MS can further be employed in certain chemometric procedures, e.g., those focused on identification and quality assurance with the commercial batches of medicinal plants traded in powdered form.

### **ACKNOWLEDGEMENT**

The work of two authors (Ł.W. and D.S.) was partially supported by the PhD scholarship granted to them in 2009 within the framework of the 'University as a Partner of the Economy Based on Science' (UPGOW) project, subsidized by the European Social Fund (EFS) of the European Union. The work of one author (M.N.) was supported by the post-doctoral grant no. 142062, subsidized by the Ministry of Science of Serbia. The authors wish to express their gratitude to Mrs Małgorzata Zych from Donau Lab (Polish representative of the firm CAMAG) for kindly lending them the CAMAG TLC-MS interface and in that way enabling this research.

## REFERENCES

- [1] Sajewicz, M.; Wojtal, Ł.; Staszek, D.; Hajnos, M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska. Low temperature planar chromatography–densitometry and gas chromatography of essential oils from different sage (*Salvia*) species. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2010**, *33*, 936-947.
- [2] Mathis, C.; Ourisson, G. Étude chimio-taxonomique du genre *Hypericum*. II. Identification de constituants de diverses huiles essentielles d'*Hypericum*. *Phytochemistry*. **1964**, *3*, 115-131.
- [3] Koch, A.; Richter, R.; Basar, S. in *Preparative Layer Chromatography*. Kowalska, T., Sherma, J., Eds.; CRC Press / Taylor and Francis Group; Boca Raton, FL 2006; 391-411.
- [4] Aranda, M.; Morlock, G. Using electrospray-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry to characterize organic compounds separated on thin-layer chromatography plates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1297-1303.
- [5] Aranda, M.; Morlock, G. Application of a Liquid Extraction Based Sealing Surface Sampling Probe for Mass Spectrometric Analysis of Dried Blood Spots and Mouse Whole-Body Thin Tissue Sections. *J. Chromatogr. Sci.* **2007**, *45*, 251-255.
- [6] Morlock, G.; Jautz, U. Comparison of two different plunger geometries for HPTLC-MS coupling via an extractor-based interface. *J. Planar. Chromatogr.* **2008**, *21*, 367-371.
- [7] Dytkiewitz E.; Morlock G. Analytical strategy for rapid identification and quantification of lubricant additives in mineral oil by high-performance thin-layer chromatography with UV absorption and fluorescence detection combined with mass spectrometry and infrared spectroscopy. *J. AOAC Int.* **2008**, *91*, 1237-1243.
- [8] Sajewicz, M.; Wojtal, Ł.; Hajnos, M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Kowalska, T. Low-temperature TLC–MS of essential oils from five different sage (*Salvia*) species. *J. Planar Chromatogr.-Modern TLC.* **2010**, *23*, 270-276.
- [9] Daszykowski, M.; Sajewicz, M.; Rzepa, J.; Hajnos, M.; Staszek, D.; Wojtal, Ł.; Kowalska, T.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Walczak B. Comparative analysis of the chromatographic fingerprints of twenty different sage (*Salvia* L.) species. *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 513-530.
- [10] Polish Pharmacopoeia VI, Polish Pharmaceutical Society, Warsaw, 2002.
- [11] Rzepa, J.; Wojtal, Ł.; Staszek, D.; Grygierczyk, G.; Labe, K.; Hajnos, M.; T. Kowalska, Waksmundzka-Hajnos, M. Fingerprint of selected *Salvia* species by HS–GC–MS analysis of their volatile fraction. *J. Chromatogr. Sci.* **2009**, *47*, 575–580.

- [12] Koch, A.; Basar, S.; Richter, R. in *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*; Waksmundzka-Hajnos, M., Sherma, J., Kowalska, T., Eds.; CRC Press / Taylor and Francis Group; Boca Raton, FL 2008; 451-480.
- [13] Sajewicz, M.; Rzepa, J.; Hajnos, M.; Wojtal, Ł.; Staszek, D.; Kowalska, T.; Waksmundzka-Hajnos, M. A GC-MS study of the performance of different volatile fraction isolating techniques and a comparison of seasonal differences in composition thereof with the sage (*Salvia* L.) species. *Acta Chromatogr.* **2009**, *21*, 453-471.
- [14] Randrianarivelo, R.; Sarterb, S.; Odouxc, E.; Bratc, P.; Lebrunc, M.; Romestandd, B.; Menute, C.; Andrianoelisoaf, H.S.; Raherimandimbyg, M.; Danthuh, P. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fragrans*. *Food Chem.* **2009**, *114*, 680-684.
- [15] Guillen, M.D.; Cabo, N.; Burillo, J. Characterisation of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *70*, 359-363.
- [16] Perrya, N.S.L.; Bollenb, C.; Perryb, E.K.; Ballardc, C. *Salvia* for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *75*, 651-659.
- [17] Langa, E.; Della Porta, G.; Palavra, A.M.F.; Urieta, J.S.; Mainar, A.M. Supercritical fluid extraction of Spanish sage essential oil: Optimization of the process parameters and modelling. *J. Supercrit. Fluids.* **2009**, *49*, 174-181.
- [18] Zrira, S.; Menut, C.; Bessiere, J.M.; Elamrani, A.; Benjilali, B. Effet du milieu sur la composition chimique de l'huile essentielle de *Salvia lavandulifolia* Vahl du Maroc. 22-èmes Journées Internationales Huiles Essentielles et Extraits; Digne Les Bains (France), 5-7 September, 2003.
- [19] Jordán, M.J.; Martinez, C.; Moñino M.I.; Lax V.; Quílez, M.; Sotomayor, J.A. Chemical characterization of *Salvia lavandulifolia* subsp. *vellerea* in South-Easter Spain. (in ISHS Acta Horticulturae 826). I International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary Herbs; Antalya (Turkey), 29 April – 4 May, 2007.
- [20] Fournier, G.; Pages, N.; Cosperec, I. Contribution to the study of *Salvia lavandulifolia* essential oil: potential toxicity attributable to sabinyol acetate. *Planta Med.* **1993**, *59*, 96-97.
- [21] Passannanti, S.; Paternostro, M.; Piozzi, F. Triterpene acids from *Salvia* and *Teucrium* species. *Phytochem.* **1983**, *22*, 1044-1045.
- [22] Escudero, J.; Perez, L.; Rabanal, R.M.; Valverde, S. Diterpenoids from *Salvia oxyodon* and *Salvia lavandulifolia*. *Phytochem.* **1983**, *22*, 85-87.

- [23] Janicsak, G.; Veres, K.; Kakasy, A.Z.; Mathe, I. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the *Lamiaceae*. *Biochem. System. Ecol.* **2006**, *34*, 392-396.
- [24] *Sage – the Genus Salvia*. Kintzios, S.E., Ed.; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands, 2000.

**Table 1** The literature data on the appearance of terpenes and terpenoids in *Salvia lavandulifolia*, and the respective molecular weights of individual compounds

Compound class	Compound and molecular formula	Molecular weight	Literature
Monoterpenes	$\alpha$ -Pinene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[11, 13-17]
	$\beta$ -Pinene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	
	Camphene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[17-19]
	$\beta$ -Mircene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[11, 13, 15, 17]
	Sabinene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[15, 17]
	$\alpha$ -Thujene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	
	$\alpha$ -Terpinene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[15-17]
	$\gamma$ -Terpinene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[15-17]
	Tricyclene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[15]
	<i>p</i> -Cymene; C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	134.22	[15-17]
	$\alpha$ -Terpinolene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136,24	
	$\beta$ - <i>trans</i> -Ocymene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[11, 13]
	<i>cis</i> -Ocymene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	
	$\tau$ -Terpinene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[11, 16, 17]
	<i>p</i> -mentha-1.4-diene; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	136.24	[11, 13]
Sesquiterpenes	$\beta$ -Chamigrene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	[11, 13]
	Cadina-3,9-diene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	$\gamma$ -Cadinene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	[15, 17]
	$\beta$ -Cadinene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	Cadina-1,4-diene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	Aromadetrene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	Sativene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	$\alpha$ -Humulene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	Farnesene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	Clovene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	ar-Curcumene; C <sub>15</sub> H <sub>22</sub>	202.33	
	$\gamma$ -Selinene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	Ledene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	

	$\alpha$ -Muurolene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	$\alpha$ -, $\beta$ -Cubebene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	$\alpha$ -Copaene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	$\alpha$ -Gurjunene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
	$\alpha$ -Ylangene; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	204.35	
Monoterpenoids	Thujol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.14	[11, 13]
	$\alpha$ -, $\beta$ -Thujone; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152.23	[11, 13, 15, 17]
	Eucalyptol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.25	[11, 13-19]
	Camphor; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152.23	
	Borneol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.14	
	Bornane-2,5-dione; C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	166.10	[15]
	Linalool; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.23	[14, 16, 17, 19]
	Bornyl acetate; C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196.29	[11, 13-15, 17]
	Bornyl propionate; C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	210.31	[15]
	Sabinyol acetate; C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	194.27	[20]
	cis-Sabinene hydrate; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.23	[15, 17]
	Pinocamphone; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152.23	[15]
	Isopinocamphone; C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O	152.23	
	Linallyl acetate; C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	196.29	[17, 19]
	$\alpha$ -Terpineol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	154.23	[15-17]
	Terpinen-4-ol; C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O		
Sesquiterpenoids	Viridiflorol; C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	222	[15, 17, 18]
	Caryophyllene oxide; C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220.34	[14-17]
Diterpenoid	Galdosol; C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	344	[22]
Triterpenoids	Oleanolic acid; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456.70	[21, 23]
	Micromeric acid; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456.70	[21]
	Maslinic acid; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	472.70	
	3-epi-Maslinic acid; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>4</sub>	472.70	
	Ursolic acid; C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> O <sub>3</sub>	456.70	[21-23]



## Captions to Figures

**FIGURE 1** (o) The densitogram obtained from the analytical thin layer chromatogram developed for the essential oils of *Salvia lavandulifolia* at  $-10 \pm 0.5^\circ\text{C}$ , with the bands of interest indicated by numerals (1)-(3), and the mass spectra of (a) band 1, (b) band 2, and (c) band 3 eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate.

**FIGURE 2** (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 1 (Fig. 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1)-(4), and the mass spectra of (a) band 1, (b), band (2), (c) band 3, and (d) band 4 from the liquid chromatogram.

**FIGURE 3** (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 2 (Fig. 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1)-(4), and the mass spectra of (a) band 1, (b), band (2), (c) band 3, and (d) band 4 from the liquid chromatogram.

**FIGURE 4** (o) Liquid chromatogram recorded by means of the LC-MS system for band 3 (Fig. 1) eluted with use of the TLC-MS interface from the chromatographic plate, with the positions of recording the mass spectra indicated by numerals (1)-(3), and the mass spectra of (a) band 1, (b), band (2), and (c) band 3 from the liquid chromatogram.

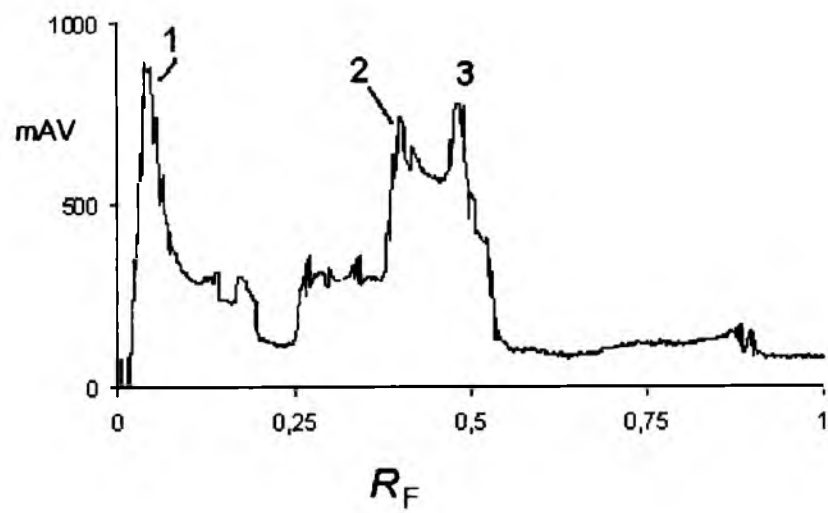


Fig. 1(o).

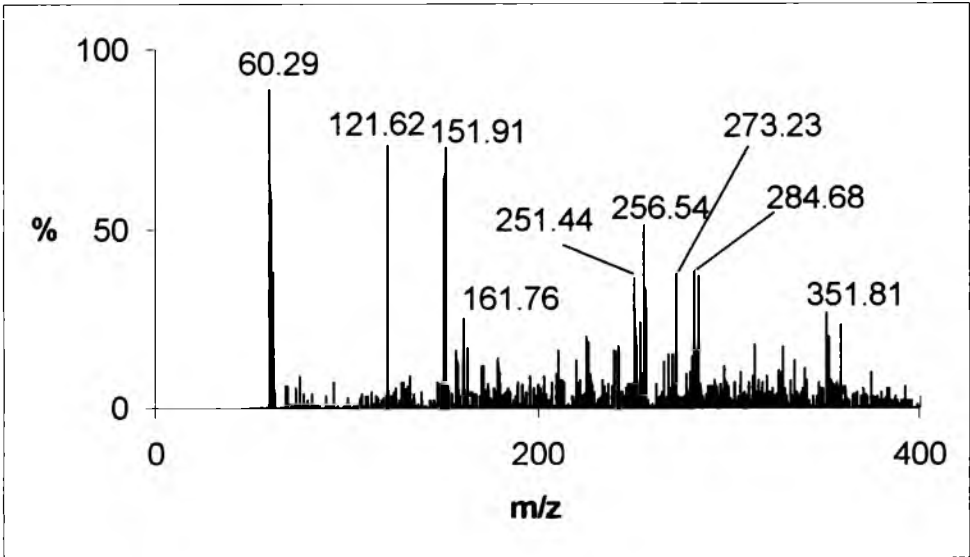
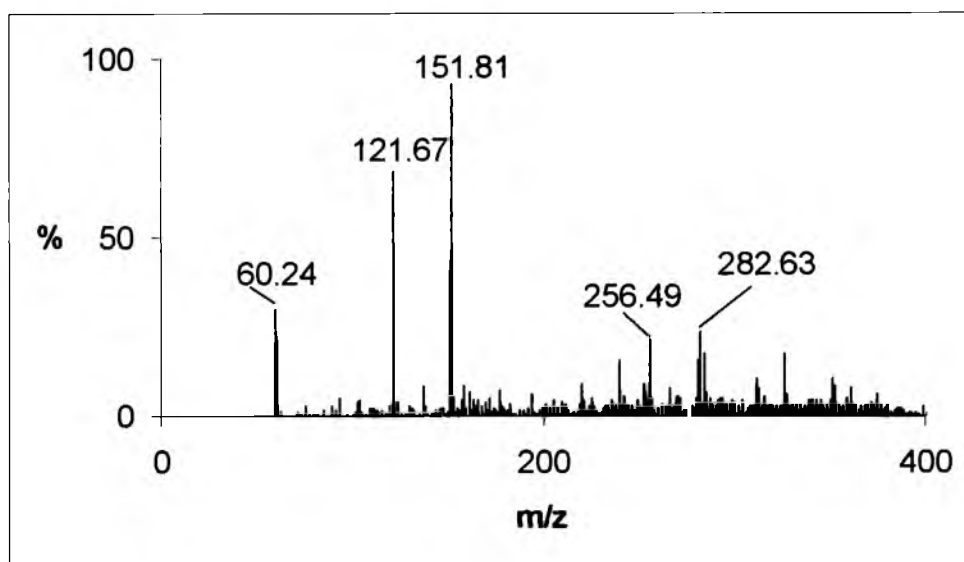
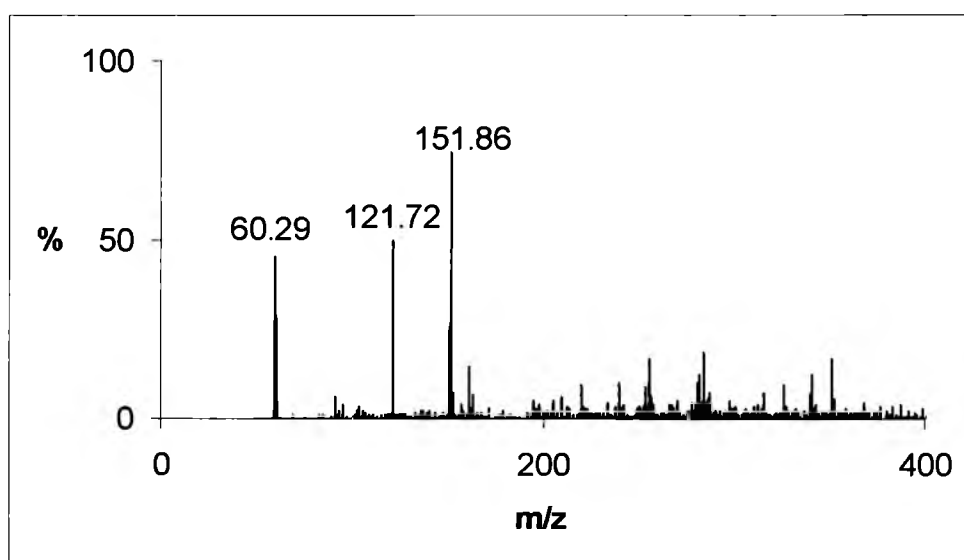


Fig. 1(a).

**Fig. 1(b).****Fig. 1(c).**

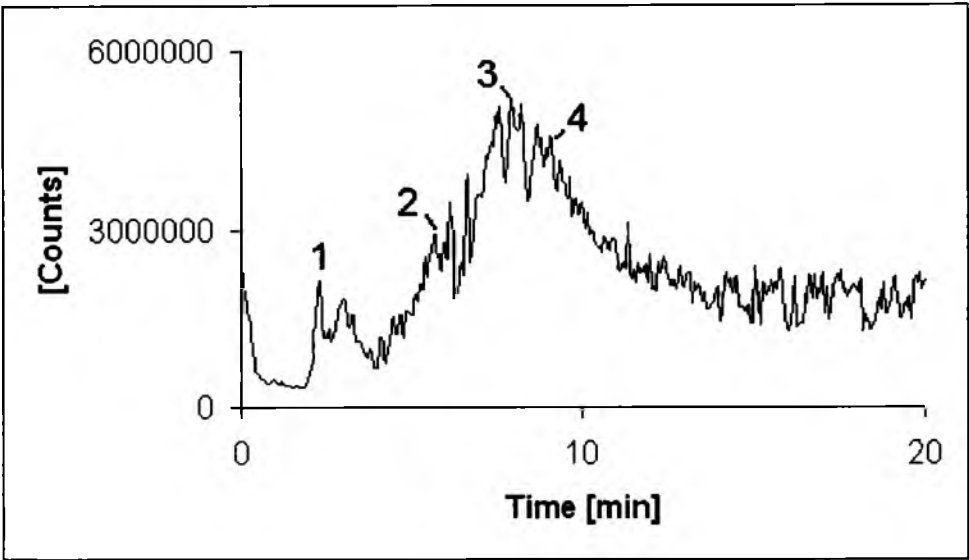


Fig. 2(o).

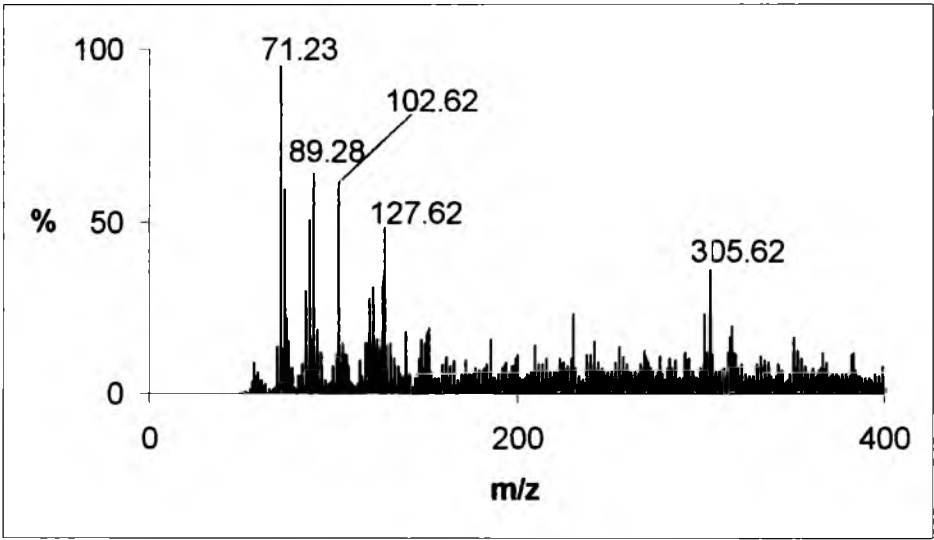
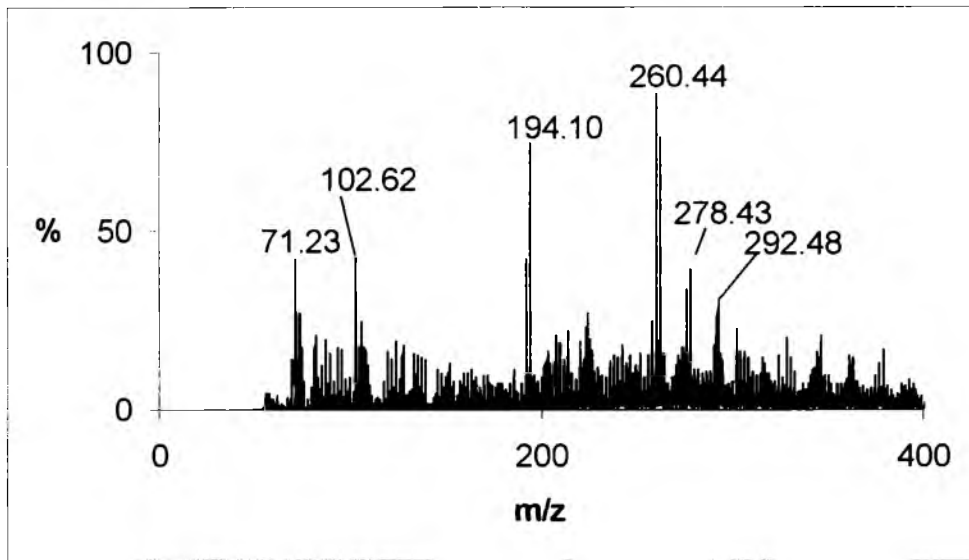
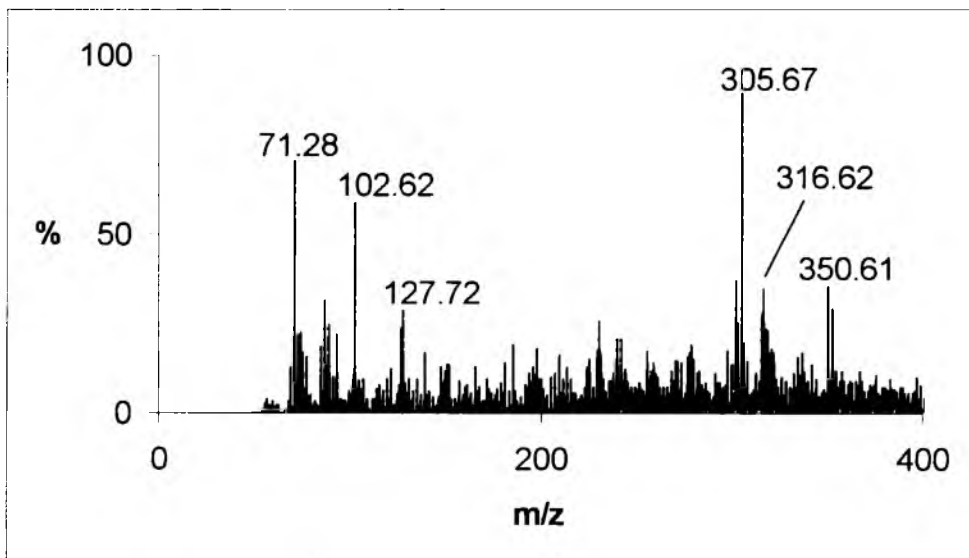
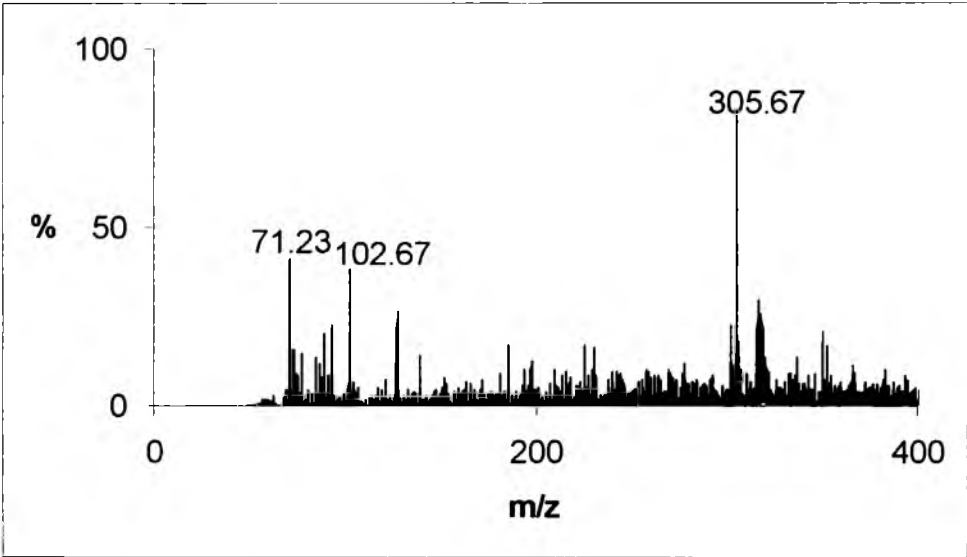


Fig. 2(a).

**Fig. 2(b).****Fig. 2(c).**



**Fig. 2(d).**

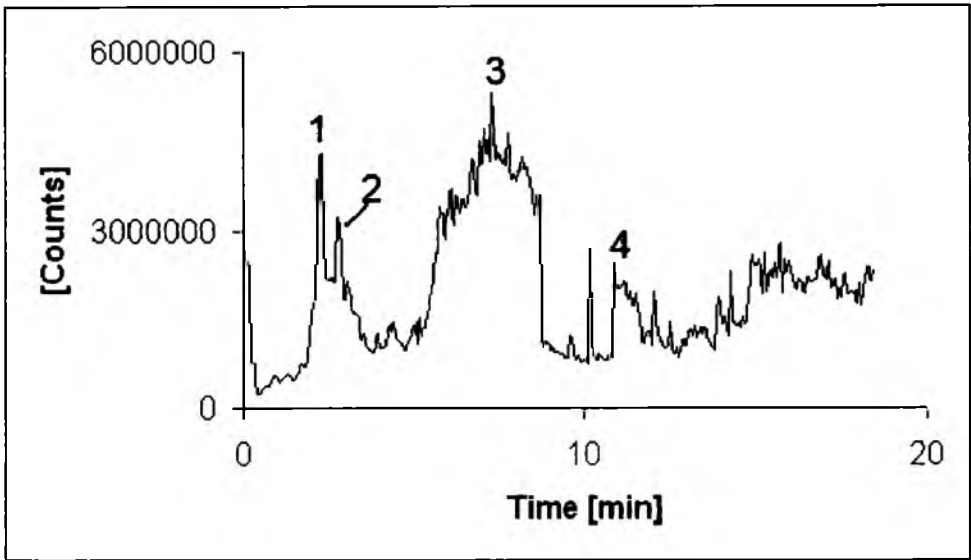


Fig. 3(o).

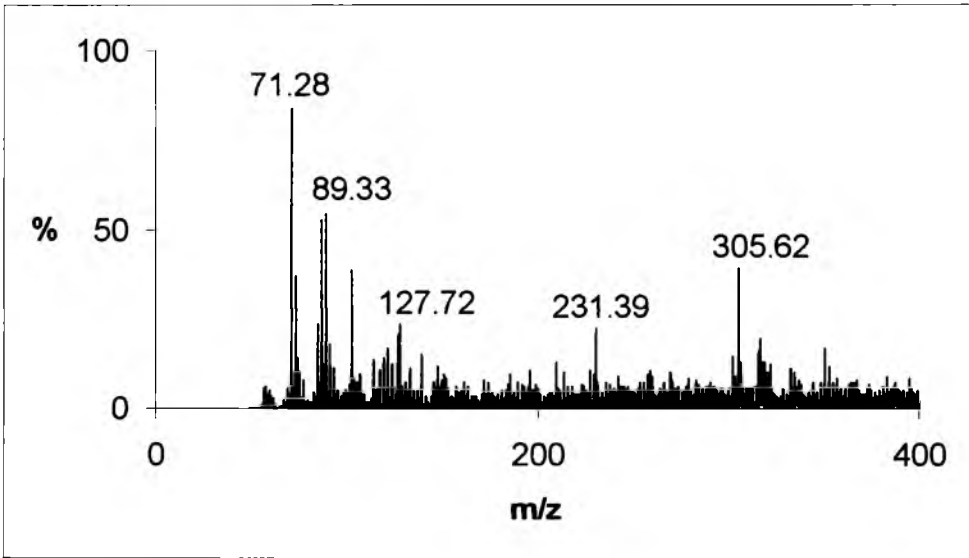
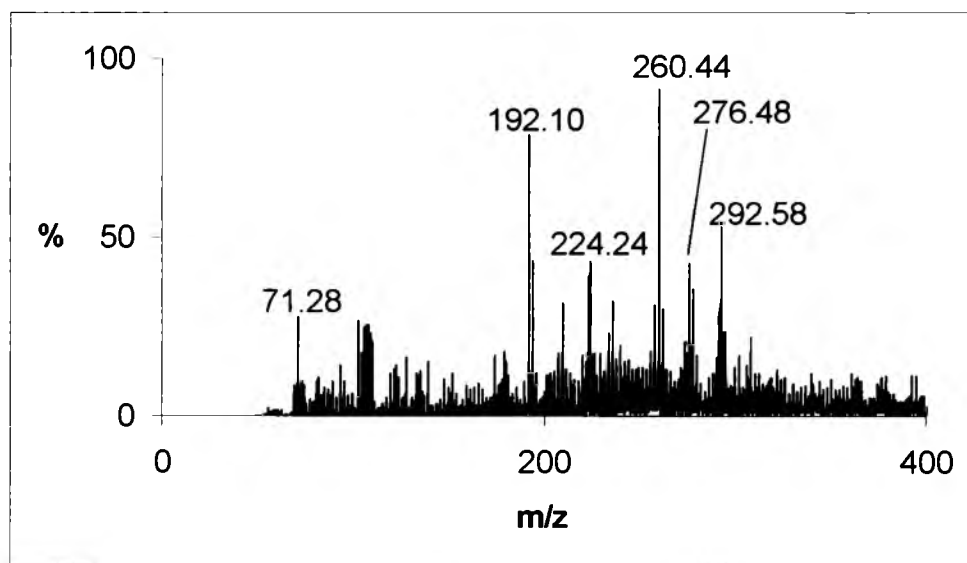
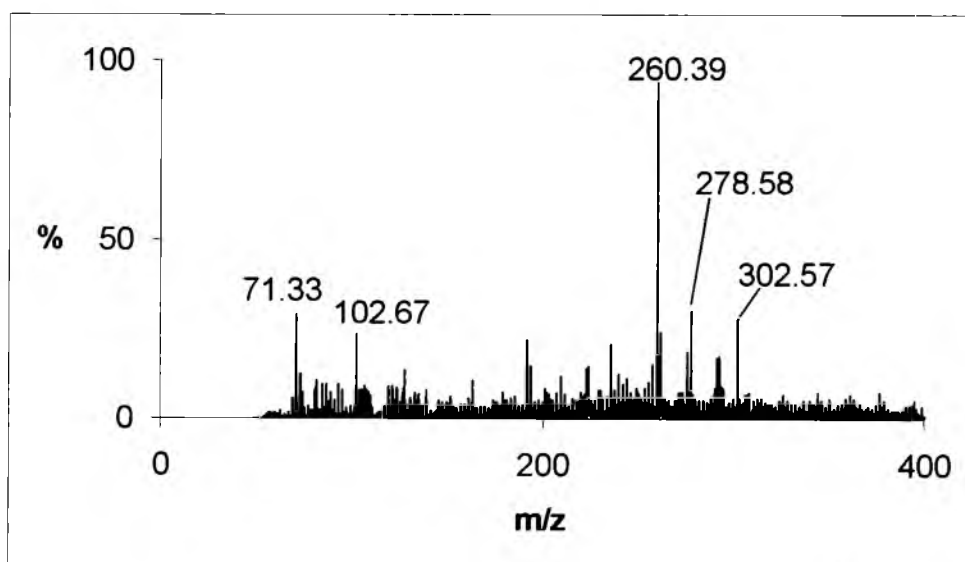
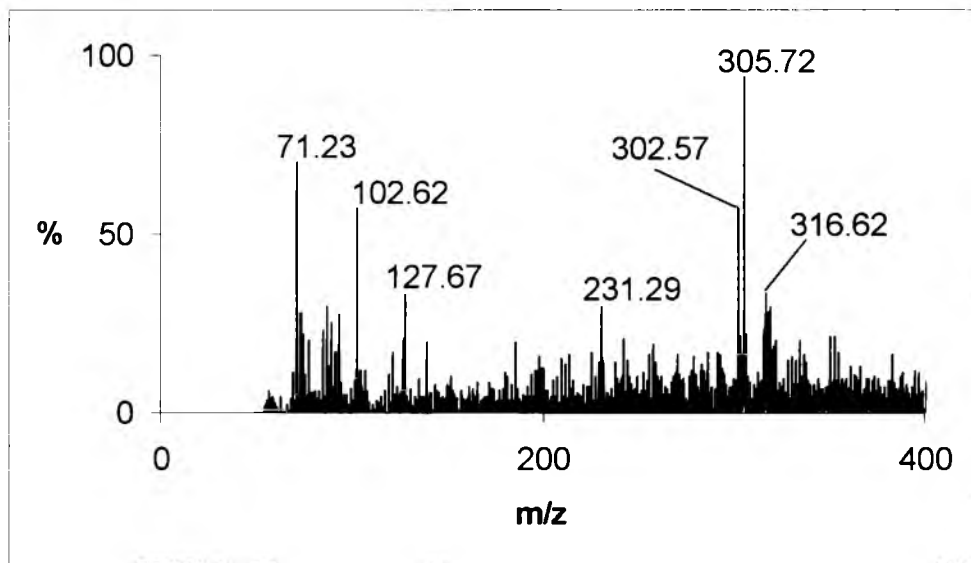


Fig. 3(a).

**Fig. 3(b).****Fig. 3(c).**





**Fig. 3(d).**

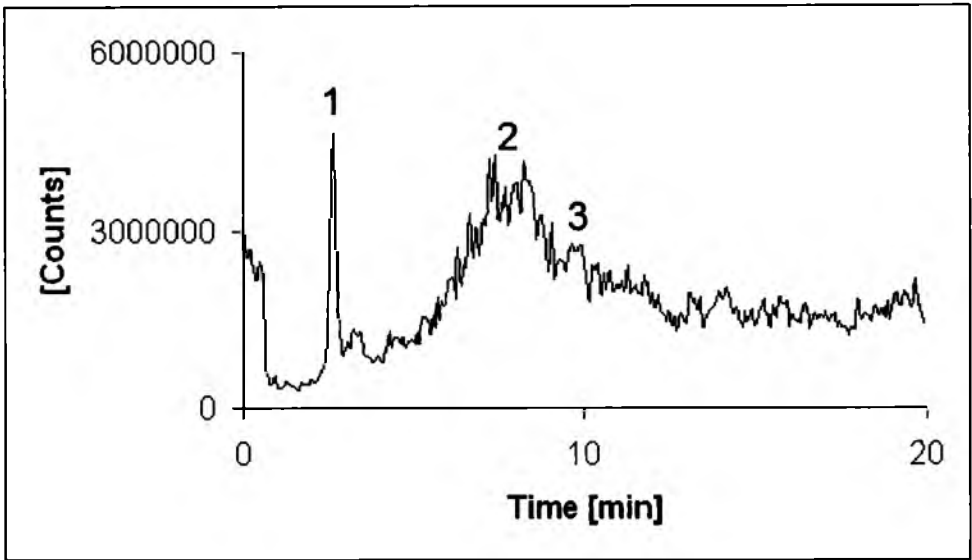


Fig. 4(o).

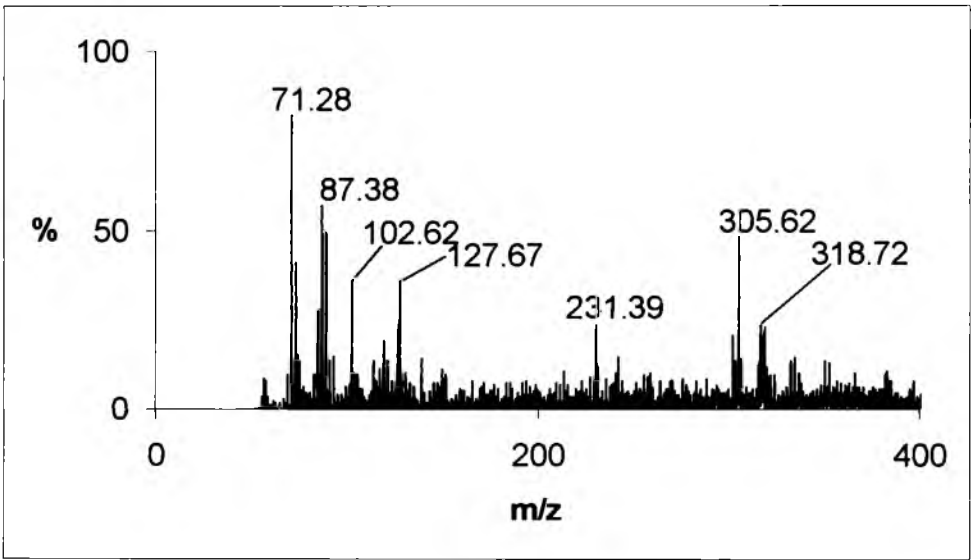
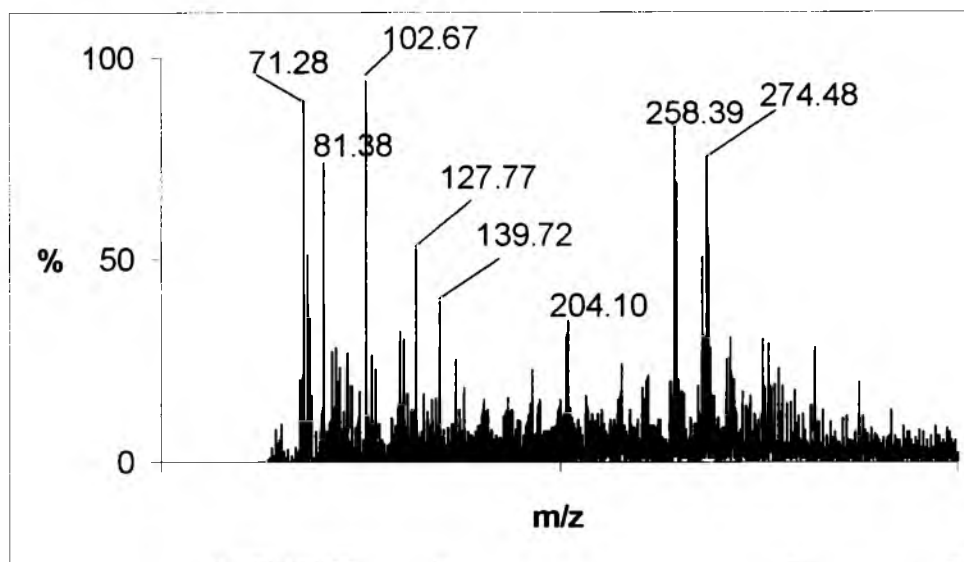
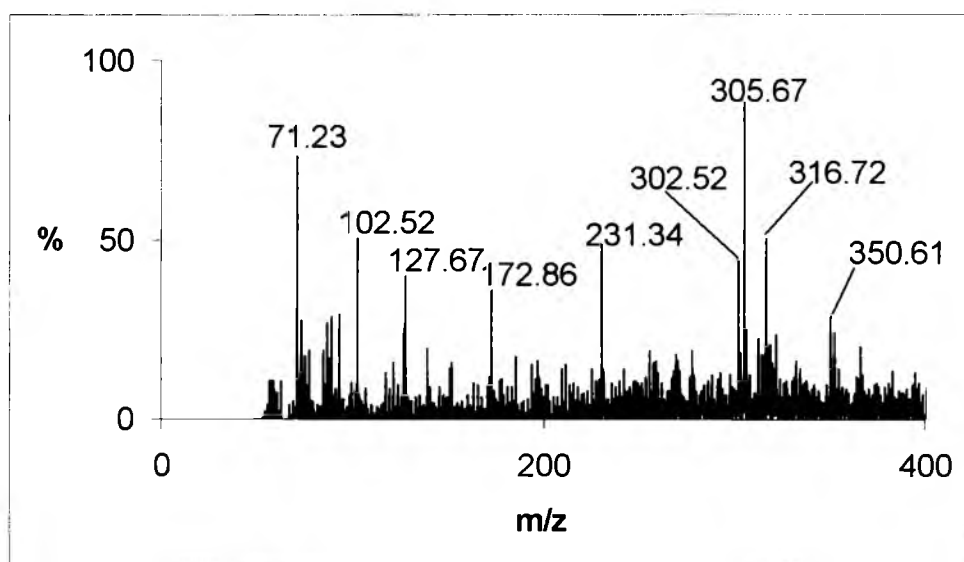


Fig. 4(a).

**Fig. 4(b).****Fig. 4(c).**